

(12)特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局(43) 国際公開日
2004年11月4日 (04.11.2004)

PCT

(10) 国際公開番号
WO 2004/095006 A1

(51) 国際特許分類7:

G01N 21/55

TECHNOLOGY AGENCY) [JP/JP]; 〒332-0012 埼玉
県川口市本町四丁目1番8号 Saitama (JP).

(21) 国際出願番号:

PCT/JP2004/004428

(72) 発明者; および

(22) 国際出願日:

2004年3月29日 (29.03.2004)

(75) 発明者/出願人(米国についてのみ): 今任 稔彦
(IMATO,Toshihiko) [JP/JP]; 〒814-0031 福岡県 福岡市
早良区南庄二丁目8番8号 307 Fukuoka (JP). 浅野
泰一 (ASANO,Yasukazu) [JP/JP]; 〒812-0053 福岡県
福岡市 東区箱崎三丁目5番38号 202 Fukuoka
(JP).

(25) 国際出願の言語:

日本語

(74) 代理人: 清水 守 (SHIMIZU,Mamoru); 〒101-0053 東
京都 千代田区 神田美土代町7番地10 大園ビル
Tokyo (JP).

(26) 国際公開の言語:

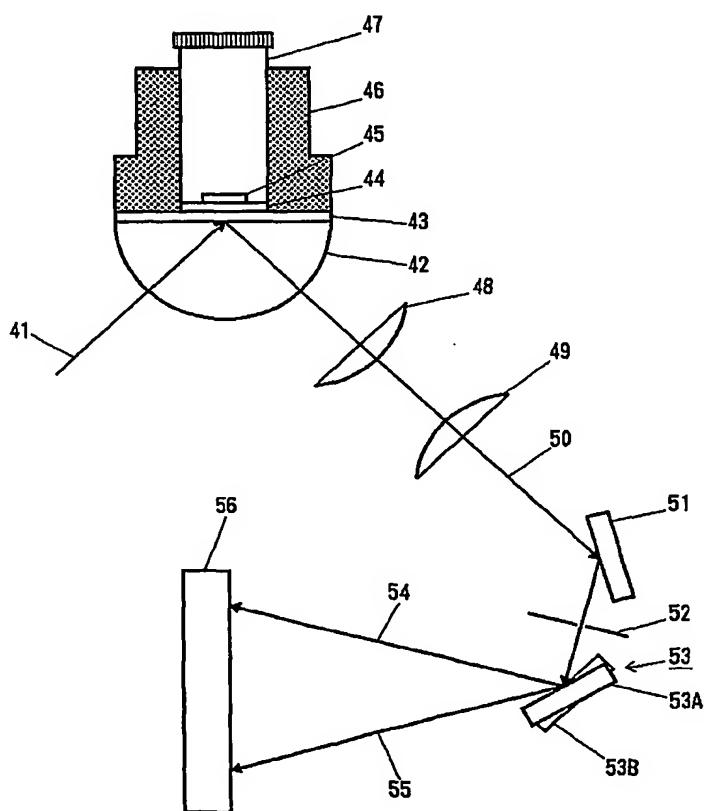
日本語

(81) 指定国(表示のない限り、全ての種類の国内保護が
可能): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR,

[続葉有]

(54) Title: DIFFERENTIAL SURFACE PLASMON RESONANCE MEASURING DEVICE AND ITS MEASURING METHOD

(54) 発明の名称: 差動式表面プラズモン共鳴現象測定装置及びその測定方法



(57) Abstract: A light beam (41) with a given wavelength from a light source is brought to a linear focus on a sensor composed of a prism (42) and a glass substrate (44). A sample cell and a reference cell are arranged along this linear focus at a predetermined interval. The reflected lights with intensities weakened by the surface plasmon resonance induced in the sensitive portions of the cells are reflected by light beam split mirrors (53) disposed at different angles and each split into two beams along two optical paths, while maintaining the same intervals between the beams as that between the centers of the sensitive portions. An adhesive optical interface film (43) having an index of refraction matched with that of the prism (42) is provided on the prism (42). An electrode composite sensor cell (47) having sensitive films corresponding to the cell portion and reference portion is pressed against the optical interface film (43) so as to measure the surface plasmon resonance occurring in each cell by using an optical system comprising a CCD line sensor (56) divided into two areas for detecting light beams.

WO 2004/095006 A1

[続葉有]



BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NA, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IT, LU, MC, NL, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

添付公開書類:
— 國際調査報告書

- (84) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の広域保護が可能): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ヨーラシア (AM, AZ, BY, KG,

2文字コード及び他の略語については、定期発行される各PCTガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語のガイダンスノート」を参照。

(57) 要約:

一定波長を持つ光源からの光 (41) を、プリズム (42) とガラス基板 (44) からなるセンサに、線焦点を結ぶように当て、この線焦点上に一定間隔を保って配置された試料セルと参照セルの各感応部で生じた表面プラズモン共鳴現象により強度の減少した反射光を、前記各感応部の中心の間隔と同じに保持しながら、互いに角度の異なる光分割ミラー (53) を用いて2光路に分割して反射させ、一つのCCDラインセンサ (56) の異なる二つの領域で検出する光学系を用いて、プリズム (42) 上に設けた該プリズム (42) と屈折率を整合させた粘着力を持つ光インターフェイス膜 (43) に試料部と参照部に対応した感応膜を併せ持った電極式複合型センサセル (47) を押し付けることによって、各セルで生じる表面プラズモン共鳴現象を測定する。

明 細 書

差動式表面プラズモン共鳴現象測定装置及びその測定方法

技術分野

本発明は、差動式表面プラズモン共鳴現象測定装置及びその測定方法に関するものである。

背景技術

20世紀後半の我が国における産業の高度発展は、我々の生活に物質的な豊かさをもたらしたが、一方ではその負の遺産として大気、水質、土壤汚染や青少年への乱用薬物の蔓延など人間社会に深刻な影響をもたらした。これらの中、無機物による大気、水質汚染についてはかなりの改善がなされたが、1990年代の初頭に明らかにされた生体への影響が心配されるダイオキシンなどに代表される環境ホルモン類、すなわち、ある種の人工低分子有機化合物による環境汚染や乱用薬物による心身の汚染、土壤汚染の解決は21世紀へ委ねられ、現在早急に解決されなければならない社会問題とされている。このことを計測化学上からみると、これらの有機化合物の測定は、濃度が極微量であり、かつ測定結果の信頼性が要求されるため、現在のところ高価でしかも操作に熟練を必要とするガスクロマトグラフィー・質量分析法で実施されている。そのため、その汚染実態を知るための情報量が少ないことも解決に至っていない大きな要因である。

一般に有機物を計る方法としては、上記したガスクロマトグラフィー・質量分析法のほか、液体クロマトグラフィー、蛍光試薬や発光試薬を用いて化学反応に基づく光を計測する方法、酵素イムノアッセイ、表面プラズモン共鳴測定法などがある。これらの方法の中で操作の簡便さを満足する方法は、表面プラズモン共鳴測定法であると考えられる。その理由を以下に述べる。

表面プラズモン共鳴測定法は、プラズマ化された金表面に光を当て、物質の相互作用に基づき100nmの領域で起こる光の共鳴現象（表面プラズモン共鳴現象；surface plasmon resonance: SPR）を測定す

る方法である。この方法は、

- (1) センサ表面で起こる化学反応をリアルタイムで追跡することができる。
- (2) 物質相互間の相互作用が 100 nm の領域で起こるので分析用試料が微量でよい。
- (3) 上記 (2) の理由より、少ない試料で高感度濃縮が可能である。
- (4) 検出系の材料にガラスプリズムを使用しているので、検出器を限りなく小さくできる。
- (5) プラズモン共鳴を起こすために金薄膜を用いているので、抗体など感応物質の固定化が容易で、測定対象を選択的に検出する検出系を構築することができる。

以上の理由により、表面プラズモン共鳴測定法はバームサイズを指向する環境汚染低分子有機化合物を計測するためのユビキタスなフィールド機器を開発するために最適な方法と考えた。

表面プラズモン共鳴とは、金属膜を蒸着したプリズムに光を入射すると、プリズム表面において常時発生しているエバネッセント波と金表面において励起された表面プラズモン波が共鳴し、反射光が減少する現象である。この表面プラズモン共鳴現象を起こす入射角度は試料溶液の誘電率によって変化するので、金属薄膜の表面に測定対象物と相互作用する物質を機能性膜として固定化することで、様々な有機物を測定するための化学センサを構築することが可能である。

この現象は応用物理の光学分野では古くから知られていて、1902年にW. O. Odによって見出され、1982年にはNylanderによってセンサ化された。これが科学的に応用されたのは最近で、金表面に抗体等を固定することによって生体膜と物質の相互作用をリアルタイムに計測することができるようになった。従来、生体膜と物質の相互作用を計測する方法としては、数日かけて相互の平衡状態を測る平衡法が一般的だったが、表面プラズモン共鳴測定法ではそれをリアルタイムで測定することができるので、免疫反応を測定する免疫センサ、蛋白質の相互作用の解析など、分析化学・生化学・薬品化学・医療計測などの広範囲な科学・産業分野で多彩な展開が図られている。

ここで、表面プラズモン共鳴現象の原理について更に詳しく説明する。

金あるいは銀のような金属をガラス基板の片面に蒸着して数十nmの箔状にして金属が蒸着されていないガラス基板側から光を当てると、表面プラズモンと呼ばれる波動が発生する。表面プラズモンとは、金属中における拘束の度合いが小さい、自由電子群のゆらぎを量子化したものという。これは音波と同じ粗密度で金属表面を接線方向に伝播することができる。そこで、伝播速度が同一の電磁波でゆさぶってやると共鳴して表面プラズモンが発生する。

金属は陽イオンの周囲を電子が自由に動くため、固体プラズマと見なすことができる。このような固体プラズマの表面付近には電子の集団励起である表面プラズマ振動（この量子が表面プラズモン）が存在している。表面プラズモンは金属表面付近のみに局在する表面波で、その波数 K_{sp} と振動数 ω の関係は金属の誘電率 ϵ_m だけでなく、金属の接している媒質（試料）の屈折率 n_s にも依存し、次式で与えられる。

$$K_{sp} = \frac{c}{\omega} \sqrt{\frac{\epsilon_m n_s^2}{\epsilon_m + n_s^2}} \quad \dots (1)$$

ここで c は真空中の光速である。

上記（1）式より、試料に接する金属（誘電率 ϵ_m が既知）の表面上での、振動数 ω の表面プラズモンの波数 K_{sp} を知れば、試料屈折率 n_s が得られる。

第1図は表面プラズモン共鳴現象の原理を示す模式図である。

この図において、1はプリズム（屈折率 n_p ）、2は金属薄膜（誘電率 ϵ ）、3は溶液試料、4は入射光（波数 K_p ）、5はエバネッセント波（波数 K_{ev} ）、6は反射光、7はCCD検出器、8は表面プラズモン（波数 K_{sp} ）である。

この図に示すように、プリズム1に金属薄膜2を蒸着し、これを試料（ここでは溶液試料）3と接触させる。プリズム1側から臨界角以上の角度でプリズム1底面（センサ面）に入射光4を入射すると、エバネッセント波5が試料3中にしみだす。入射光4として平面波（波数 K_p ）を入射角 θ で入射すると、エバネッセント波5の波数 K_{ev} は入射光4の空間周波数のプリズム底面方向成分

$$K_{ev} = K_p \sin \theta \quad \dots (2)$$

となる。臨界角以上の入射角では $K_p \sin \theta > K_s$ （ K_s は試料3中を伝搬す

る光の波数) なので、

$$K_{ev} = K_s \sin \theta > K_s \quad \dots (3)$$

となる。すなわち、エバネッセント波 5 の波数 K_{ev} は試料 3 中を伝播する光の波数 K_s よりも大きい。このため、 $K_{ev} = K_{sp}$ を満足する入射角 θ_{sp} が存在し、その角度 θ_{sp} で入射した光 4 は、そのエバネッセント波 5 によって表面プラズモン 8 を共鳴励起する。エバネッセント波 5 により表面プラズモン 8 が励起されると光のエネルギーの一部が表面プラズモン 8 に移り、プリズム 1 中に戻る反射光 6 の強度が減少する。このため、プリズム 1 側での反射率のエバネッセント波 5 の波数 K_{ev} 依存性または平面波入射時の入射角依存性を測定すると、吸収ピークとして表面プラズモン 8 の励起が観測される。この吸収ピークの位置 (波数 K_{ev} または入射角 θ_{sp}) が表面プラズモン 8 の波数 K_{sp} を与え、これから上記 (1) 式と (2) 式をもちいて試料屈折率 n_s を知ることができる。溶液試料 3 においてはその屈折率 n_s は溶液の濃度に依存するため屈折率測定より濃度の測定を行うことができる。

また、第 2 図に示すように、金属薄膜 2 表面上に測定物質と相互作用する物質を機能性膜 9 として固定化することで、この機能性膜 9 の誘電率と厚さは変化 (各種の反応・結合) し、共鳴角は変化する。この角度変化をリアルタイムで測定することで各種の反応・結合の様子、速度、量およびサンプル濃度等を測定することができる。なお、第 2 図は表面プラズモン共鳴現象を利用する免疫計測の例を示している。

次に、従来のプラズモン共鳴現象測定装置について説明する。

第 3 図は差動式表面プラズモン共鳴現象測定装置の概要図である。

この図において、11 は光源、12 はビームスプリッター、13 は S P R 検出器、14 は試料用光検出器、15, 18 はプリアンプ、16, 19 は A/D コンバータ、17 は参照用光検出器、20 はインターフェイス (I/F)、21 はコンピュータである。

第 3 図に示すように、従来の光学系は光源 11 からの光をビームスプリッター 12 で二光路に分けて、プリズムで構成される S P R 検出器 13 の定められた 2 点にあて、表面プラズモン共鳴現象によって生じた光の減少を二つの独立した光

検出器 14, 17 で検出し、各々プリアンプ 15, 18 で増幅するという方式がとられていた。

第 4 図は従来の表面プラズモン共鳴測定装置の検出系を示す図である。

この図において、22 はプリズム、23 は光インターフェイスオイル膜、24 はセンサ、25 は試料、26 は送液ポンプ、27 はフローセル、28 はフローセルホルダー、29 は光である。

この図に示すように、従来の検出系は、送液ポンプ 26、フローセル 27、セルホルダー 28、センサ 24、及びプリズム 22 との光整合性を保つための光インターフェイスオイル膜 23 で構成されていた。

〔特許文献 1〕特開 2000-039401 号公報

〔特許文献 2〕特開 2001-183292 号公報

〔特許文献 3〕特開 2001-255267 号公報

〔特許文献 4〕特許第 3356212 号公報

〔特許文献 5〕特開 2003-185572 号公報

発明の開示

しかしながら、上記した第 3 図に示すような複光路方式では、ビームスプリッター 12 で二光路に分けるためプリズムの小型化に限界があること、光検出系が二つ必要であることなどにより、構造的にある程度のスペースが必要であり、パームサイズを指向するにはその小型化に限界があった。

そもそも、表面プラズモン共鳴測定装置はビアコア株式会社や日本レーザー電子株式会社から既に市販されているが、そのサイズは $760 \times 350 \times 610$ cm (W × D × H) と大きく、また重さは 50 kg (ビアコア社: BIAcore 1000) と重いため、実験室での使用に限られていた。

従って、現状では試料の表面プラズモン共鳴現象を測る場合には、試料を実験室に持ち帰らなければならず、現場で生きた測定結果を得ることは不可能であった。

さらに、第 4 図に示すような検出系の構成では、計測システムは必然的に大型となり、いつでも、どこでも計測できるユビキタス、オンサイト、フィールドユ

ースを指向するパームサイズ差動式表面プラズモン共鳴現象測定装置の仕様を満足することはできなかった。

本発明は、このような表面プラズモン共鳴計測の現状を打破するために、光学系と検出系に新たな考え方を導入して、小型・安価であって操作に熟練を要さず、野外においても、誰でもが、どこでも、いつでも気軽に使って、しかも測定結果に信頼性のある、pH測定用ガラス電極のようにセンサ感覚で使えるパームサイズの差動式表面プラズモン共鳴現象測定装置を環境汚染有機物計測用として提供する。

すなわち、本発明は、上記状況に鑑みて、安価・小型のうえ操作に熟練を要しないユビキタスな計測器として構築される差動式表面プラズモン共鳴現象測定装置及びその測定方法を提供することを目的とする。

本発明は、上記目的を達成するために、

[1] 差動式表面プラズモン共鳴現象測定装置において、入射光の入射角が共鳴角を含んだ前後の角度になるような入射光学系と、一束の入射光の照射範囲にプリズムに蒸着した薄膜上の試料溶液固定部と参照溶液固定部がともに含まれるように配置される試料セット装置と、前記試料溶液固定部と参照溶液固定部からの反射光をそれぞれ分離し、それらの反射光の向きを変え1ライン上に投影する投影光学系と、前記反射光を1ライン上のCCDで受光するリニアCCDセンサとを具備することを特徴とする。

[2] 上記[1]記載の差動式表面プラズモン共鳴現象測定装置において、前記投影光学系は、前記試料溶液固定部と参照溶液固定部からの反射光をそれぞれ分離し、それらの反射光の向きを変え1ライン上に投影する複数個のミラーを具備することを特徴とする。

[3] 上記[2]記載の差動式表面プラズモン共鳴現象測定装置において、前記複数個のミラーは、前記試料溶液固定部からの反射光を第1の角度で反射する第1のミラーと、前記参照溶液固定部からの反射光を第2の角度で反射する第2のミラーとを具備することを特徴とする。

[4] 上記[1]記載の差動式表面プラズモン共鳴現象測定装置において、前記プリズムの上にこのプリズムとその屈折率を整合させた粘着力を持つ光インタ

一フェイス膜を具備することを特徴とする。

[5] 差動式表面プラズモン共鳴現象測定方法において、一定波長を持つ光源からの光をプリズムとガラス基板からなるセンサに線焦点を結ぶように当て、この線焦点上に一定間隔を保って配置された試料セルと参照セルの感応部で生じた表面プラズモン共鳴現象により強度が減少した反射光を、前記試料セルと参照セルの感応部の中心間隔と同じに保持しながら、互いに角度の異なる光分割ミラーを用いて反射させ、試料光と参照光を2光路に分割して、一つのCCDラインセンサの異なる二つの領域で検出する光学系を用いて、前記プリズムの上にこのプリズムとその屈折率を整合させた粘着力を持つ光インターフェイス膜に試料部と参照部に対応した感応膜を併せ持った電極式複合型センサセルを押し付けることによって、前記センサ、前記光インターフェイス膜およびプリズム間の光整合性を保ち、前記試料セルと参照セルで生じる表面プラズモン共鳴現象を測定することを特徴とする。

[6] 上記[5]記載の差動式表面プラズモン共鳴現象測定方法において、前記光インターフェイス膜が高分子光インターフェイス粘着膜であることを特徴とする。

[7] 上記[6]記載の差動式表面プラズモン共鳴現象測定方法において、前記高分子がポリ塩化ビニールであることを特徴とする。

[8] 上記[6]又は[7]記載の差動式表面プラズモン共鳴現象測定方法において、前記光インターフェイス粘着膜上に前記プリズム及びガラス基板と同一の屈折率を持つマッチングオイルなしで前記試料セルを設定することを特徴とする。

[9] 上記[8]記載の差動式表面プラズモン共鳴現象測定方法において、機能性物質と相互作用があり、かつその結果屈折率が変化するような物質の化学センサ化を行うことを特徴とする。

[10] 上記[9]記載の差動式表面プラズモン共鳴現象測定方法において、前記試料セルに抗体を固定するとによって抗原-抗体反応を測定する免疫センサ化を行うことを特徴とする。

[11] 上記[5]記載の差動式表面プラズモン共鳴現象測定方法において、

前記電極式複合型センサセルを押し付けは 20 ニュートン程度の力によることを特徴とする。

図面の簡単な説明

第 1 図は、表面プラズモン共鳴現象の原理を示す模式図である。

第 2 図は、表面プラズモン共鳴現象を利用する免疫計測の模式図である。

第 3 図は、従来の差動式表面プラズモン共鳴現象測定装置の概要図である。

第 4 図は、従来の差動式表面プラズモン共鳴現象測定装置の検出系の模式図である。

第 5 図は、本発明の差動式表面プラズモン共鳴現象測定装置の概要図である。

第 6 図は、本発明によるパームサイズ差動式表面プラズモン共鳴現象測定装置の光学系の模式図である。

第 7 図は、本発明によるパームサイズ差動式表面プラズモン共鳴現象測定装置の測定点を複合型ダブルセンサセルの上部から示した図である。

第 8 図は、本発明によるパームサイズ差動式表面プラズモン共鳴現象測定装置の分割ミラーの構成図（その 1）である。

第 9 図は、本発明によるパームサイズ差動式表面プラズモン共鳴現象測定装置の分割ミラーの構成図（その 2）である。

第 10 図は、本発明によるパームサイズ差動式表面プラズモン共鳴現象測定装置の分割ミラーを用いる一光検出器二光検出の概要を示す図である。

第 11 図は、本発明によるパームサイズ差動式表面プラズモン共鳴現象測定装置の検出系の概要図である。

第 12 図は、表面プラズモン共鳴現象計測の化学センサ化を示す図である。

第 13 図は、電極式 S P R 用複合型センサセルの光照射面を示す図である。

第 14 図は、S P R 用センサセルの位置設定ガイドを示す図である。

第 15 図は、光インターフェイス粘着膜を用いた検出系の模式図である。

第 16 図は、高分子光インターフェイス粘着膜の作製方法の概要図である。

第 17 図は、本発明における差動方式による S P R 強度と共鳴角変化の関係を示す図である。

第18図は、本発明におけるP B S緩衝液（p H 7. 4）における共鳴角の安定性を示す図である。

第19図は、シングル式装置による共鳴角信号の安定性を示す図である。

第20図は、本発明にかかる試作した複合型センサセルの構造を示す図である。

第21図は、本発明による差動式表面プラズモン共鳴現象測定装置への2-4ジクロロフェノールの濃度変化追従性を示す図である。

発明を実施するための最良の形態

本発明は、複合型センサセルの採用により真の意味で表面プラズモン共鳴現象のリアルタイム計測という利点を機器として具現化したもので、小型であり、外乱に強く、操作は極めて簡便である。

詳細には、環境汚染物質測定のためのユビキタスな計測器の具備すべき条件として

（1）高感度、（2）簡便操作、（3）装置に可動部がない、（4）小型、（5）軽量、（6）オンサイト計測ができる、（7）ポータブルである、（8）安価、（9）電池駆動、（10）信頼性が高い、（11）化学センサ化されている、ということが必要であるが、本発明は、かかるユビキタスな計測器としての条件を十分に満足するものである。

本発明は、誰でもどこでも使えるユビキタスな表面プラズモン共鳴現象測定センサを目指したもので、（1）光照射範囲の薄膜上に試料感応部分と参照感応部分が含まれるようにし、両部分からの反射光を分割ミラーでそれぞれからの反射光に分割したうえで、一つのリニアC C Dラインセンサ上に並べて結像させる光学系、（2）試料感応部分と参照感応部分をプリズムに蒸着された薄膜上に簡便にセット、支持できるセンサセルを中心とする検出系、および（3）粘着性に優れ屈折率もマッチングオイルと同等で、かつマッチングオイル使用時に不可欠なセンサ基盤とプリズムとの機械的押し付けが不要となる、従来のマッチングオイルに代わるフィールド計測で扱いやすい光インターフェイス粘着膜、とから構成される。本発明によれば、試料と参照の両部分を同時に計測することができるのと、計測のリアルタイム性が達成されるばかりでなく、ユビキタス使用に適した

小型・簡便な高感度センサが実現できる。

〔実施例〕

以下、本発明の実施の形態について詳細に説明する。

第5図は本発明の差動式表面プラズモン共鳴現象測定装置の概要図である。

この図において、31は光源、32は試料セル32Aと参照セル32BからなるSPR検出器、33は光分割ミラー、34は試料光、35は参照光、36は光検出器、37はプリアンプ、38はA/Dコンバータ、39はインターフェイス、40はコンピュータである。

本発明の差動式表面プラズモン共鳴現象測定装置は、従来法のSPR測定装置の小型化における構造上の限界を打破するために、第5図に示すように、光分割ミラー33を用いて单一光源、单一光検出器を用いたSPRのための新規光学系を提供することにより、SPR測定装置のパームサイズ化〔10×170×50cm (H×W×D)〕と装置の軽量化(770g)を実現した。本発明に基づくパームサイズ差動式表面プラズモン共鳴現象測定装置は、光学系、検出系、電気系の各ユニットと、ノート型コンピュータ(WINDOWS XP対応)及びSPR信号を取り込んで濃度変換するためのコンピュータソフトウェア(DUAL SPRWIN)で構成される。

第6図は本発明によるパームサイズ差動式表面プラズモン共鳴現象測定装置の光学系の模式図、第7図はそのプラズモン共鳴現象測定装置の測定点を複合型ダブルセンサセルの上部から示した図である。

これらの図において、41は光源LED(波長770nm)からの入射光、42はプリズム、43は高分子光インターフェイス粘着膜、44はガラス基板、45は感応膜、45Aは試料感応膜、45Bは参照感応膜、dは試料感応膜45Aと参照感応膜45Bの中心からの距離(それぞれの測定点45a, 45b間の距離)で、本実施例では全体的なサイズとの兼ね合いでその間隔は5mmとした。46はセンサ支持体、47は電極式複合型ダブルセンサセルであり、その下部にはSPRを測定するポイントである試料感応膜45Aと参照感応膜45Bが配置されており、これらの感応膜45の下面に配置されるガラス基板44に高分子光インターフェイス粘着膜43を押し付けて試料と参照のSPRを測定するセンサ

を構成している。48はシリンドリカルレンズ、49は平凸レンズ、50はS P R反射光、51は反射ミラー、52はスリット、53は一方の分割ミラー53Aと他方の分割ミラー53Bからなる分割ミラー、54は一方の分割ミラー53Aからの反射光、55は他方の分割ミラー53Bからの反射光、56は両反射光54、55を1ライン上に投影するリニアCCDラインセンサである。

上記したように、二つのミラー53A、53Bから構成される光分割ミラー53で、試料感応膜45Aの測定点45a（第7図参照）からの反射光と参照感応膜45Bの測定点45b（第7図参照）からの反射光を二つにわける。つまり、ダブルセンサセル47下部に配置された試料・参照それぞれの感応膜45A、45Bにおいて試料と参照の誘電率に基づいて発生するS P Rによって生じた反射光50を、二枚の光分割ミラー53A、53Bによって試料からの反射光54と、参照からの反射光55とに分割し、これらの反射光54、55を1ライン上に投影するリニアCCDラインセンサ56に投影させる。

本発明では単一光源からの光41を試料と参照の感応膜45A、45Bに線焦点を結ぶように当て、試料及び参照の感応膜45A、45B面で表面プラズモン現象を生ぜしめ、両者における反射光50を分割ミラー53を用いて試料光と参照光とに分割して、そのエネルギーを失うことなく、一つのリニアCCDラインセンサ56の1ライン上に投影する。つまり、差動法の電極式複合型ダブルセンサセル47と線焦点結像方式及び反射光分割ミラーがその特徴である。

以下、そのプラズモン共鳴現象測定装置の分割ミラーの詳細な配置を示す。

第8図はそのプラズモン共鳴現象測定装置の分割ミラーの構成図（その1）、第9図はそのプラズモン共鳴現象測定装置の分割ミラーの構成図（その2）、第10図はその分割ミラーを用いる一光検出器二光検出の概要を示す図である。

感応膜45Aと45Bからの反射光50を二つの分割ミラー53A、53Bを用いてリニアCCDラインセンサ56の等分なセンサ領域に投影するには、二つのミラー53A、53Bを2段階にわたって角度調整することが必要となる。

以下に分割ミラー53A及び53Bの配置と角度調整について詳細に説明する。

反射光50を試料光と参照光に分割するための分割ミラー53A及び53Bは、第10図に示すように、それぞれの分割ミラー53A、53B上にある光分割点

58Aおよび58Bが、Z軸57上に位置し、かつ試料感応膜の測定点45a及び参照感応膜の測定点45bからの光をそれぞれ含んで、距離dを置くような位置に配置した。

第8図に示したように、分割ミラー53A及び53Bを、光分割点58Aおよび58B点上のZ軸57を中心にして、リニアCCDラインセンサ56方向（図の右方向）へ試料感応膜の測定点45aおよび参照感応膜の測定点45bにおけるSPR反射光50を二分割するように、角度 α 、 β を持つように配置した。

さらに、第9図に示すように分割ミラー53A及び53Bは、Z軸57からリニアCCDセンサ56のライン状光素子を含むXY平面とリニアCCDセンサ56のライン上へ試料感応膜の測定点45aと参照感応膜の測定点45bにおけるSPR反射光50を集光するように、その角度を θ 、 γ に調整した。

以上述べたように試料感応膜の測定点45aと参照感応膜の測定点45bにおける反射光の間隔を距離dに保つように、二つの分割ミラー53A、53Bの角度を2段階に調整して、検出点から受光点に至るまでの光路差のない二つの反射光54、55を作ることによって、試料感応膜の測定点45aおよび参照感応膜の測定点45bからの反射光50、すなわちSPRシグナル像を歪みのない同じサイズの光として、リニアCCDセンサ56のライン状光素子の上に等分割する。この結果、装置のパームサイズ化を実現することができた。

次に、本発明のパームサイズ差動式表面プラズモン共鳴測定装置の検出系について説明する。

パームサイズ差動式表面プラズモン共鳴測定装置を構築するに当たっては、光学系のみならず検出系も合わせてパームサイズ化する必要がある。そのため、本来の目的を達成するためには、送液ポンプなどを必要としない化学センサ感覚で使用することのできる検出系を開発する必要があった。

第11図は本発明におけるパームサイズ差動式表面プラズモン共鳴測定装置の検出系の概要図であり、第11図（a）はパームサイズ差動式表面プラズモン共鳴測定装置の検出系の模式図、第11図（b）は第11図（a）のA-A線断面図である。

これらの図において、61はプリズム、62は高分子光インターフェイス粘着

膜、63はセンサ、64は試料セル64Aと参照セル64Bからなるダブルセンサセル、65はセンサセルガイド、66はセンサセル支持管、67はセンサセルキャップである。

この図から明らかなように、本発明による差動式表面プラズモン共鳴現象測定装置の検出系にはポンプもセンサホルダーも必要としない。例えば、化学センサとしてよく知られているものにpH測定用ガラス電極がある。このセンサは、ガラスまたはプラスチック製のセンサセル支持管の先端にセンサとしてのpH応答性ガラス膜が装着されていて、銀-塩化銀で構成される参照電極と組み合わせて試料に挿入すると、試料のpHに応じた電位差が発生するものである。そこで、本発明のSPR計測の化学センサ化の概念を明確にするために、従来のpH測定用ガラス電極を用いpHを測定する場合〔第12図(a)〕と対比して、表面プラズモン共鳴現象(SPR)を計測する場合〔第12図(b)〕の化学センサ化の概念を示した。

第12図(a)において、71は試料、72はpH測定用ガラス電極73と銀-塩化銀参照電極74で構成される円筒状の複合型pH電極、75はpH測定用ガラス電極73と銀-塩化銀参照電極74の間で発生する電位を測定するための電位差計である。複合型pH電極72は、その直径が12mm、長さが150mm程度の棒状のものである。このように検出部分が化学センサ化されると、検出部が本体から分離されるため本体の構成が簡単になり、装置の小型化が容易になる。この類のものには、他に溶存酸素計、イオン濃度計などがある。

第12図(b)は、本発明に基づく化学センサ化されたSPR計測の概要を最も単純な化学計測システムであるpH測定用ガラス電極〔第12図(a)〕と対比して示したものである。

第12図(b)において、81はSPR信号の変化を検出するためのSPR検出器、82は一定のエネルギーを持つ光をプリズムを介してセンサに伝えるための高分子光インターフェイス粘着膜であり、プリズムに密着している。83は、第12図(a)における複合型pH電極72に相当するSPR用電極式複合型ダブルセンサセルであって、複合型SPR電極というべきもので、その形状は直径が14mm、長さ25mm程度の円筒形である。電位や電流を測定する棒状のセ

ンサを電極すなわちELECTRODEというのに対し、このセンサセルは、SPRを測定するための棒状のセンサという意味において、SPR電極即ちSPRODEとして定義付けることができる。84は計測時にセンサセルを固定するためのセンサセルガイドである。85は試料セル、86は参照セル、85Aは試料液、86Bは参照液である。87はセンサセルの基盤を成す厚さが0.1mm程度のガラス基板（膜）、88はガラス基板87に蒸着された厚さ45nmの金薄膜、89はその金薄膜88に化学的に固定された抗体等の感応膜である。90はプラスチック製のセンサセル支持体、91は厚さ1mm程度のシリコンシート、92はセンサセルキャップである。

第13図は、電極式SPR用複合型センサセルの光照射面を示したものである。第13図において101はプリズムとセンサセルの界面で線焦点に結像した光、104Aは試料セル底部に位置する試料感応膜の中心点、104Bは参照セル底部に位置する参照感応膜すなわち金蒸着膜の中心点である。これらの点104Aと104Bの距離は、5mm一定とした。112はガラス基板（膜）、113はガラス基板112の上側に位置する参照感応膜、114はガラス基板112の上側に位置する抗体などが固定化された試料感応膜、115はセンサセル支持管である。

第14図は、SPR用センサセルの位置設定ガイドを示したものである。第14図において、109はセンサセルガイド、117はセンサセルキャップである。118Aと118Bは、センサセルガイド109を本体であるSPR検出器に固定するためのネジ孔である。119Aはセンサセルガイド側の測定位置設定ガイドライン、119Bはセンサセル側の測定位置設定ガイドラインである。

本発明ではSPRを起こすために線焦点幅として100μm、長さ10mm程度の光をプリズムに当てている。従って、試料感応膜と参照感応膜のSPRを起こすための反応点は、試料感応膜と参照感応膜の各々の中心点がその距離d=5mmの間隔を保って、かつ線焦点上に位置を決め、線焦点上に合わせてセンサセルガイド側の測定位置設定ガイドライン119Aを線焦点上に合わせた後、ネジ孔118Aと118Bで本体とセンサセルガイド109を固定している。ネジ孔118Aと118Bはセンサセルガイド109と本体の固定およびSPRを検出

するための位置決めの二役を担っており、その孔径は自由度を持って設計されている。

次に、高分子光インターフェイス粘着膜について説明する。

従来、基本的に、センサのベースとなる金蒸着膜は、プリズムに直接蒸着される。この方法では、計測時のランニングコストが上がるために、通常は顕微鏡観察に用いるカバーガラスに金を蒸着してこれをセンサ基盤にしている。このような測定方式では、プリズムとセンサ基盤であるガラス基板との間の光整合性をとるためにプリズム及びガラス基板と同一の屈折率を持つマッチングオイルを塗る必要があった。また、表面プラズモン共鳴現象は、金表面 100 nm 以下の領域で起こる現象であるため、フローセルとガラス基板およびプリズムをオイルを介して均一に機械的に押し付けて、平滑性を保ちながら測定しなければならなかつた。しかしながら、このような方法はフィールド計測にはそぐわない。そこで本発明では、光整合性をとりセンサセルを簡単に固定するための高分子光インターフェイス粘着膜を新たに開発した。

オイルを使わない光インターフェイス粘着膜については、既に本発明者らの報告がある。しかしながらこの方法は、膜の再現性、透明性、粘着性に難点があつた。本発明の高分子光インターフェイス粘着膜は、先に本発明者らが提案した膜を改良したものとして位置づけることができる。

高分子膜をマッチングオイルに代わる光インターフェイス粘着膜として使用するためには、（1）無色透明で、（2）粘着性が大きいこと、（3）屈折率がマッチングオイルと同じかあるいはそれにほとんど近く、（4）分析化学的には、マッチングオイルと比較して S P R 信号が絶対的に等しいか、あるいは相対的に対応するなどを考慮しなければならない。これらの条件を満たすために、まず最初に上記条件を満足させるための高分子膜の作製方法を検討した。高分子材料として、入手しやすいポリ塩化ビニール（PVC：重合度 700）を用い、通常の PVC ラッピングフィルムを作る操作に倣って新しい光インターフェイス粘着膜を開発した。

第 15 図はその高分子光インターフェイス粘着膜を用いた検出系の模式図である。

この図において、121はプリズム、122は高分子光インターフェイス粘着膜、123はガラス膜（基板）、124は金蒸着膜、125は試料感応膜、126は試料溶液である。この図に示すように、光インターフェイスの固体膜化が図られている。

第16図はその高分子光インターフェイス粘着膜の作製方法の概要図であり、この図を参照しながら以下に基本的な操作を示す。

PVC粉末をテトラヒドロフラン（THF）で溶解し、可塑剤としてフタル酸-2-エチルヘキシル（DOP）とリン酸トリトル（TCP）を加えた後、シャーレを用いてキャスチングし、温度制御のできるコーニング製プレート乾燥機を用いて、120°Cで2時間加熱乾燥させることによって、無色透明な膜が再現性よくできることができることが明らかになった。次に乾燥温度の影響を調べた。その結果、SPR用の膜としては、乾燥温度は低い方がよく、実験の結果、80°Cで作製した膜が粘着と脱着性能においてSPR用として優れていた。

この検討結果は、PVCに対して高い親和性を持ち、相互作用を弱め、結果的には融点を低下させる働きをしている可塑剤は、乾燥温度を80°Cに制御することによって、PVCの分子間の滑りを向上し、その結果ゴム弾性と粘着性が発現したものと考えられた。一方、PVCは可塑剤と温度の影響によって分子間力から解放され、分子間の滑りがよくなつて柔らかくなり、結晶から無色透明のガラス状膜へ転移されたものと考えられた。

次に可塑剤とPVCの組成が異なる種々のPVC膜を作製し屈折率を測定した。屈折率測定は、ATAGO社製のアッペ屈折計を用いた。その結果、PVC0.2gに対してDOPとTCPの量がそれぞれ0.5gの組成の膜が屈折率1.5211を示し、マッチングオイルの屈折率1.5150に最も屈折率が近かったので、この組成の膜を光インターフェイス粘着膜として新たに採用することにした。この膜をあらかじめ、センサセルの先端、あるいはプリズムに密着させた後、センサセルのガイドラインに合わせて、センサセルの円筒状のソーター中へローディングし、センサセルを人差し指で、プリズムに約20ニュートン（N）の力で押し付けることによって最適なSPR信号を得ることができる。

以上、本発明の基幹をなす光学系、検出系、高分子光インターフェイス粘着膜

についてその詳細を述べたが、これらの発明を盛り込んだパームサイズ差動式表面プラズモン共鳴測定装置は次のような仕様を持つ。

(1) 装置

原理：表面プラズモン共鳴現象（S P R）

差動方式：分割ミラー・一受光素子

S P R計測配置：K r e c h m a n n配置

測定範囲：6 5 ~ 7 5°

電源：交直両用（1 0 0 V または 9 V バッテリー）

最大連続時間：1 0 時間

サイズ：1 7 0 × 1 0 0 × 5 0 mm

本体重量：7 7 0 g

(2) 光学系

光源：点光源型L E D（波長 7 7 0 nm、半値幅 5 0 nm）

プリズム材質：B K 7

偏光フィルタ：消光比 0. 0 0 0 7 1

受光素子：2 0 4 8 p i x e l C C D ラインセンサ

金基盤サイズ：1 4 mm 角以内

光インターフェイス：粘着性P V C 膜

(3) 検出系

センサセル：複合型エスピーロード

フローセル：流量 1 ~ 1 0 0 μ l / m i n

試料サイズ：1 μ l 以上

(4) 性能

共鳴角安定性

シングルライン：0. 0 0 0 2°

差動ライン：0. 0 0 0 4°

次に、本発明によって試作した差動方式表面プラズモン共鳴現象測定装置の実施例について説明する。

本発明に基づいて、差動方式表面プラズモン共鳴現象を検出するための光学系、

複合型センサセル及びPVC光インターフェイス粘着膜を試作し、差動方式表面プラズモン共鳴現象測定装置としてシステム化して、装置の性能評価を行った。

1. SPR強度と共鳴角変化の関係

第17図は、本発明における差動方式によるSPR強度と共鳴角変化の関係を示したものである。第17図(a)は複合型センサセルの試料セルAと参照セルBにpH 7.4緩衝液を入れたプランクにおけるSPR曲線を示したものである。プランクにおいてはSPR強度は試料セルAと参照セルBにおいて同じであるからSPRは重なっている。第17図(b)は、参照セルBはそのままに、試料セルAをpH 7.4緩衝液で0.1 mol/l濃度のグルコースに変化させた場合のSPR曲線の変化を示したものである。共鳴角はグルコース濃度の変化に従つて変化していることが分かり、この試料と参照の共鳴角の差をとることによって、差動式表面プラズモン共鳴現象測定装置を構築することができる明らかなった。このようなSPR曲線の変化が観察されるということは、複合型センサセルの2点におけるSPR現象の差が、分割ミラーによって正しく二分割されていることを示しているものと考えられた。

2. 本発明による共鳴角の安定性

第18図は、本発明におけるPBS緩衝液(pH 7.4)における共鳴角の安定性を示したものである。第18図(b)は、参照セルの共鳴角の変化を示すシングルライン[B]、第18図(a)は、試料セルと参照セルの共鳴角の変化の差を示す差動ライン[A-B]を示したものである。この結果、本発明による共鳴角度の安定性は、シングルラインで0.0002°、差動ラインで0.0004°であった。一方、同様の原理に基づくシングル方式表面プラズモン共鳴現象測定装置で得られる安定性は、第19図に示したように、0.001°で本発明による差動方式はシングル方式に比べ角度分解能が5倍上がっていることが明らかになった。差動ラインの角度安定性は、0.0004°とシングルラインに比べて大きくなっているが、試料セルAと参照セルBの共鳴角の差をとることによるマイナスのばらつきの影響と考えられた。本発明の光学系は、シングル方式と同じ2048 pixel数のCCDラインセンサを使用している。差動方式においては、センサセルからの反射光を分割ミラーによって二分割しているために、

実用 pixel 数を 900 から、約半分の 500 に落としている。その結果、シングルラインの分解能が 5 倍向上したのではないかと考えられたため、分割ミラーを調整して実用 pixel 数を 250 に落としてみた。その結果を表 1 に示した。

〔表 1〕

項目 測定方式	光源	CCD ラインセンサ	CCD信号処理	実用pixel数	シングルライン 共鳴角度安定性	差動ライン 共鳴角度安定性
シングル				900	0.001	—
差動 1	770nmLED	2048pixel	3秒/サンプリング, 7回測定の 移動平均	500	0.0002	0.00004
差動 2				250	0.00004	0.00008

この表 1 から明らかなように、予想どおり、シングルラインの共鳴角の安定性は 0.00004° と更に 5 倍分解能が向上した。同様の理由で差動ラインの共鳴角の安定性は 0.00008° であった。以上述べたように、本発明における光学系を用いた差動方式表面プラズモン共鳴現象測定装置で得られる共鳴角の分解能は、実用 pixel 数に反比例するという新しい知見が得られた。

3. 免疫計測への適用

本発明に基づく差動方式表面プラズモン共鳴現象測定装置による免疫計測の可能性を明らかにするために、複合型センサセルを試作し、ダイオキシン類似物として知られる 2-4ジクロロフェノールの S P R 計測を検討した。

試作した複合型センサセルの構造を図 16 に示した。この図に示したように、本体 $\phi 14\text{ mm}$ 、高さ 20 mm のサイズを持つ複合型センサセル 130 は、 45 nm の厚さの金膜 136 を蒸着したガラス基板 135、エポキシ樹脂製の支持管 134、 $\phi 16\text{ mm}$ のセンサセルキャップ 131 で構成した。試料セル 132 と参照セル 133 の内径は $\phi 3.5\text{ mm}$ 、両者の中心間の距離は 5 mm とした。この複合型センサセル 130 の試料セル 132 に常法に従って 2-4ジクロロフェノール抗体を固定して 2-4ジクロロフェノール複合型免疫センサとした。2-4ジクロロフェノール複合型免疫センサを 4 個用意し、参照セル 133 には P B

S緩衝液（pH 7.4）を参照液として注入した。試料セル132にはそれぞれPBS緩衝液で濃度を調整した10, 25, 50, 100 ppmの2-4ジクロロフェノール溶液を注入し、測定用センサセルとした。定量操作はあらかじめ測定装置本体に固定されているPVC光インターフェイス粘着膜にセンサガイドを通じて複合型センサセルを静かに落とし込み、約20Nの力をかけて人差し指で押さえつけ、プリズムに結像した10mmの線焦点上で試料セル132と参照セル133のSPR感應面の1点で生じるSPRによって減少する試料と参照の反射光をCCD受光素子で計測した。

このようにして得られた検量線を第21図に示した。この図から明らかなように、センサセル間に固体差があるにも関わらず2-4ジクロロフェノールの濃度が10から100 ppmの濃度領域において、良好な検量線が得られ、その重相関係数は0.973であった。これらの結果から、本発明に基づく差動方式表面プラズモン共鳴現象測定装置は、複合型センサセルの試料セルに抗体を固定することによって、抗体を標識することなく、抗原-抗体反応を簡単にリアルタイムで測定できることがわかった。なお、ここではSPR法の免疫センサ化について述べたが、本発明はSPR計測の化学センサ化という点において汎用性があり、機能性物質と相互作用があり、かつその結果屈折率が変化するような物質であれば、すべて化学センサ化することができることは言うまでもない。

以上、本発明における実施例を示した。本発明は、従来ラボにおいて、研究用にその用途が限定されていたSPR計測を、

- (1) 光学系を創案することによって、小型化、差動化、高分解能化を実現し、
- (2) 定量操作の簡便化を図るために、高分子光インターフェイス粘着膜と複合型センサセルを考案して、安価で、誰でもが、どこでも、手軽に操作できるユビキタスなポータブルの小型機器として、化学センサ化したことに意義があると考えられる。

現在、しのびよる化学物質汚染としてダイオキシンなどの環境ホルモンや覚醒剤、麻薬などの低分子有機化合物による社会的な影響が憂慮されている。しかしながら、上記有害な有機化合物に関しては、測定用の機器が高価でしかも操作が難しいために、科学的な情報が乏しく、オンラインで誰でもがどこでも簡単に操

作でき、多面的な情報を得ることのできる携帯用機器への要望が高い。しかし、従来、化学物質をセンサによって簡便に測定するセンサ侵漬型パームサイズ機器としてはpH、DO（溶存酸素）、ある種のイオン等、無機物に測定対象が限定されており、有機物用の簡易測定装置というものは存在しなかった。本発明は認識物質を固定化した試料感応膜と参照感応膜を組み合わせた複合型センサセルという概念を提供することによって、有機物に対するセンサープッシュ式新規SPR簡易計測法（エスピーロード法：S p r o d e m e t r y）への道を開くものであると考えられる。しかしながら、環境ホルモンなど低分子有機化合物の環境における濃度は極めて小さく、通常ppt（pg/ml）からppb（ng/ml）もオーダーである。

一方、分子量が200前後の低分子有機化合物に対するSPR法による免疫計測における直接計測における検出感度は、100ng/ml程度である。一般に2-4ジクロロフェノール（分子量：175）のような低分子有機化合物の免疫計測の高感度化には、抗体と抗原を添加して抗体固定化センサと競合させる競合法がよく用いられている。この方法の感度は5ppd程度である。しかしながら、このような方法では定量操作が一つ増えることになり、SPR法の特色であるリアルタイム計測の利点を損なうので好ましくない。しかしながら、SPR法の絶対感度不足は、直接測定が可能な固相抽出によって補完することができる。固相抽出法は、その汎用性と1000倍濃縮が簡単にできるので、SPR法の感度不足を補完する手段として有効である。表2は、固相抽出法の可能性を知るために、2-4ジクロロフェノールに対する125倍濃縮を検討した結果である。

〔表2〕

2-4ジクロロフェノール 原水(ppb)	濃縮結果 (ppm)	濃縮倍率	濃縮誤差 (%)
10	11.67	117	-6
30	31.04	103	-18
50	61.25	123	-2

抽出カラムは、I S T社のジビニールベンゼン系カラム、E N V₊（固相重量200mg、リザーバー容量6ml）を用いた。濃縮条件は、試料1L（pH2）、流量60ml/min、溶出条件は、0.1%ギ酸/50%メタノール8mlであった。この表2から明らかなように、抽出過程でのロスはあるものの、ppbオーダーの2-4ジクロロフェノールが、平均-8.7%の濃縮誤差で確実にppmオーダーに濃縮されることが明らかになった。現時点においても上記の検討した結果と固相抽出を組み合わせることで、本発明による測定装置を用いてppbオーダーの2-4ジクロロフェノールの定量ができるといえる。SPRは、センサー界面100nmの領域で起こるため、定量に用いる試料は1μl程度で十分である。従って、このSPRの利点を生かして、分析用試料は1μlを得るための抽出カラムのマイクロサイズ化を行うことにより、さらに濃縮効率を向上させることができる。この場合には、1Lの原水で1pptの2-4ジクロロフェノールの定量が可能になると考えられる。

以上、本発明の実施例について述べた。本発明による差動方式表面プラズモン共鳴現象測定装置は、SPR計測用としてパームサイズながら、ラボ用として使用が限定されていた従来の装置と同等またはそれ以上の基本性能を有していることが明らかになった。また、従来装置がなしえなかつた、どこでも、誰でもという携帯性と簡便性をも具備している。本発明が社会に具現した暁には、有機物が関与する環境、分析化学、医薬、安全、化学産業、研究などのそれぞれの分野において、本発明に基づく差動方式プラズモン共鳴現象測定装置によって、ユビキタスなアプローチが行われ、多くの有力な化学情報が生まれ、そしてそれらの情報に基づいて各分野において適切な判断が行われ、結果として、人間社会の改善や進歩に本発明が貢献することは確実である。

最後に本発明の効果について概括する。

1. 光学系

本発明による光学系の特徴は次の通りである。従来型の光学系では、プリズム上のサンプルチップの1点を測定していたが、本発明では、SPRシグナルを含むプリズム上の2点からの反射光を光検出器へ入射する際に、その手前に置かれた2個の分割ミラーにより光検出器の2位置にそれぞれ分けて投影することによ

り、プリズム上のセンサ上の 2 点を測定可能にしたことがある。得られる S P R シグナルの理論分解能は、従来と同じ素子を持つリニア C C D 素子を使用した場合、半分となるが、従来のコンピュータ演算による高分解能ピーク検出に必要なデータポイント数は十分にあるので、角度分解能上の問題はないと考えられる。

一方、従来の光学系のまま、リニア C C D センサを 2 個用意した場合、エレクトロニクスとしてプリアンプ 2 台、A / D 変換器 2 台が必要となり、コストもサイズもアップせざるを得ないことになる。従って、本発明の光学系の効果は、次に述べる各項目において明らかである。

(1) 差動化及び小型化

単一のリニア C C D センサの構成を生かして、表面プラズモン共鳴現象測定装置を差動化及び小型化するための新規光学系としてその意義が認められる。事実試作器においてその大きさとサイズは、170 × 100 × 50 cm (W × H × D) 、770 g を実現した。また、本発明による光学系は、分割ミラーを反射ミラーに変えることにより、従来同様の単能光学系としても利用することができる。

(2) 温度補償

従来型のサンプル 1 点のみの測定では、S P R シグナルは原理的にサンプルの屈折率（または誘電率）を測定しているため、温度によるドリフトがある。これを補償する手段は、別途温度計測用として高分解能を持つ半導体温度センサ等を設け、得られる温度データより S P R シグナルデータを演算により校正する必要があった。S P R シグナルは、バイオセンサとして抗原一抗体反応に使用される場合、その変化量は極めて少ない。そこで、差動式 S P R で同一サンプルチップ上の 2 点の測定位置にサンプル溶液 1 点、温度補償用として温度係数の大きなサンプルを 1 点用意することにより、この温度センサの代替目的での使用が可能となる。また、前記に加えて、S P R シグナルの温度補償を行う場合、その温度特性とマッチングした温度センサが必要となるが、本発明では、同一センサ上の 2 点の測定位置にそれぞれ試料溶液、温度補償用としてサンプルと同一溶液組成でかつ分析対象を含まない参照溶液を用意することにより、同一組成溶液で屈折率及び温度変化をリアルタイムで補償して、抗原抗体反応本来の S P R 信号を計測することが出来る。

(3) S P Rリアルタイム計測

同一センサ上の試料セルと参照セル2点に試料液と、試料と同じ溶液組成で分析対象を含まない参照液を用意し、この2点を同時に測定することにより、S P R信号の反応前ゼロ点を常時測定し、このゼロ点と試料計測時におけるS P R信号を同時に計測し、その差を求ることによって、分析対象との反応後のS P R信号をリアルタイムに計測することができる。また、同一センサ上の試料セルに試料液を、参照セル2点の測定位置に試料と同じ溶液組成で既知の濃度の分析対象を含む参照液を用意し、2点を同時に測定することにより、反応量基準となる参照液のS P R信号を常時測定し、この参照液によるS P R信号と試料液によるS P R信号との差を1つの検出器上で同時に観測し、分析対象との大小比較をリアルタイムに観測することができるので、スクリーニング的、オンオフ警報的利用も可能となる。

(4) 多点計測

本発明の詳細を述べるに当たって、プリズムとP V C光インターフェイス粘着膜を介して、S P R複合型センサセルの5 mm間隔の2点におけるS P R信号を分割ミラーによって、試料部と参照部におけるS P R信号に分けて一つの光検出器上に分けて測定する2点差動方式を中心に説明してあるが、測定点の間隔をさらに短くしたり、センサをマイクロチップ化することによって、あるいは逆にセンサやプリズムをある程度大きくすることによって、基本的に同じ光学系で分割ミラーを3, 4, 5…n分割ミラーを用いて、一つに光検出器で3, 4, 5…n点の測定点を同一検出器上で、多点S P R計測することも可能となる。

2. 検出系

(1) 複合型センサセル (S P r o d e)

複合型センサセルは、従来の表面プラズモン計測の可能性を更に発展させ、S P R計測の化学センサ化を実現したものである。一般に、p H測定用ガラス電極は、水素イオン濃度に選択的に応答するガラス膜の界面で生じる電気化学的な現象を棒状のセンサで測定するという意味においてp H electrode (ピーエッヂエレクトロード)と称されている。本発明において提案するS P R用複合型センサセルは、測定対象と選択的応答する感應膜界面で生じる光の変化であ

る表面プラズモン共鳴現象をpH電極同様の棒状のセンサで測定するものである。従って、本発明に基づく複合型センサセルは、SPRに基づく光を検出原理とする新たな化学センサ、即ちSPRode（エスピーロード）として定義付けることができ、化学センサ分野における新領域が誕生したことになる。

以上述べたように、本発明によるSPR計測の化学センサ化によって、従来研究用に限られていた表面プラズモン計測がより簡便化され、誰でもが、どこでも、いつでも使用することのできるオンライン用のフィールド機器として、新たな展開が期待される。

表面プラズモン共鳴現象を検出するための従来法は、光整合性オイルを介してセンサの上にフローセルをセルホルダーを用いて機械的に密着させてから、まず最初にフローセルにポンプで参照液を送液して、この際生じるSPRの光強度を記憶し、次に試料について同様の操作を行い、SPR信号の差を測定対象成分の濃度に対応させていた。しかしながら、小型化、フィールド機器化に際して、このような方法では、試料を送液するための高価なポンプ及びフローセルを機械的に押さえつけるためのセルホルダーをSPRの計測のために必要とするため、小型化と計測操作の簡便化に限界があること、参照液と試料液の測定に時間差があり、真の意味でリアルタイム計測ではないこと、差動化するためには少なくとも2流路が必要で、構造的にスペースに限界があることなど検出系サイドにおいても解決すべき問題が残されていた。

本発明では以上述べた従来法の持つ問題点が複合型センサセルおよび高分子光インターフェイス粘着膜の考案により解決された。本発明により、LED光源（波長770nm）を用いて、SPRを起こすためのエネルギーとしての可視光線を複合型センサセル上の試料感応膜と参照感応膜に線焦点として当て、試料感応膜と参照感応膜の1点で同時に起こるSPR信号を同時に測定するため、試料と参照のSPR信号の相対値は真の意味でリアルタイムになった。また本発明によれば、計測すべき試料が多い場合には、参照セルに基準液を入れておくことにより、オンオフ／スクリーニング的応用も容易となる。

（2）センシングにおけるリアルタイム計測

従来の簡易免疫法としては、イライザ法として知られている酵素免疫法が一

一般的である。この方法は、抗原一抗体反応を酵素の系に導いて定量すること、物理的な非特異的吸着の影響を除くためB／F分離が必要であることなどの理由でリアルタイム計測ではない。このような方法では定量操作に時間がかかり、オンライン、フィールド計測には適当でない。一方、SPR計測は原理的にリアルタイム計測である。しかしながら、フローセルを用いる計測では、プランクの測定をした後に試料の測定を行い、その信号の差をとるので厳密にはリアルタイムではない。試料やプランクのセンサへの導入のためにポンプを用いない本発明の複合型センサセル方式では試料セルと参照セルの線焦点上の一定間隔の一点でSPRが起こるため、CCDラインセンサ上で検出される反射光は時間差がなくリアルタイム計測される。

(3) SPR免疫計測の信頼性

従来のライザ法は上記(2)で述べたように、免疫反応に基づく情報を得るためにB／F分離が必要であった。本発明の複合型センサセル方式では試料セルと参照セルで起こるSPRを同じに測定できるので、試料セルで免疫反応に基づく信号、非特異的信号、パルク成分の信号を、参照セルで非特異的信号、パルク成分の信号を同時に計測することによって、B／F分離操作をすることなしに、選択的に免疫反応に基づく信号測定をすることができる。

3. 高分子光インターフェイス粘着膜

従来法ではプリズムとセンサ間の光整合性をとるために、プリズムとセンサ基盤であるガラス基板と同じ屈折率を持つマッチングオイルを測定を開始する前にその都度プリズム表面に塗り、その上にガラス基板からなるセンサをセットし、かつセンサとプリズムとの密着性を図るためにセンサホルダーで機械的に押し付ける必要があった。また、マッチングオイルには毒性があるので、その使用に細心の注意が必要である。従って、このようなオイルの使用はフィールドユースを指向する装置には不適当である。本発明では最初にプリズムにPVCインターフェイス粘着膜を固定しておけば、あとは複合型センサセルをインターフェイス粘着膜に人差し指で押し付けるだけでよい。その膜には粘着性があるのでセンサセルホルダーを必要としない。また、その膜の溶剤は、PVCにより固体化されているのでオイルに比べると遙かに安全性は高い。本発明による差動式表面プラズ

モン共鳴測定装置は、高分子光インターフェイス粘着膜の採用により、より小型化され、定量操作はより安全、簡便になった。

以上、本発明における主な効果を述べたが、本発明による差動式表面プラズモン共鳴測定装置は、複合型センサセルの採用により真の意味で S P R 計測のリアルタイム計測という利点を機器として具現化したもので、小さくて、外乱に強く、操作は極めて簡便である。

なお、本発明は上記実施例に限定されるものではなく、本発明の趣旨に基づき種々の変形が可能であり、これらを本発明の範囲から排除するものではない。

産業上の利用可能性

本発明の差動式表面プラズモン共鳴現象測定装置及びその測定方法は、パームサイズを指向する環境汚染低分子有機物を計測するためのユビキタスなフィールド機器として好適である。

請求の範囲

1.

- (a) 入射光の入射角が共鳴角を含んだ前後の角度になるような入射光学系と、
- (b) 一束の入射光の照射範囲にプリズムに蒸着した薄膜上の試料溶液固定部と参照溶液固定部がともに含まれるように配置される試料セット装置と、
- (c) 前記試料溶液固定部と参照溶液固定部からの反射光をそれぞれ分離し、それらの反射光の向きを変え 1 ライン上に投影する投影光学系と、
- (d) 前記反射光を 1 ライン上の C C D で受光するリニア C C D センサとを具備することを特徴とする差動式表面プラズモン共鳴現象測定装置。

2. 請求項 1 記載の差動式表面プラズモン共鳴現象測定装置において、前記投影光学系は、前記試料溶液固定部と参照溶液固定部からの反射光をそれぞれ分離し、それらの反射光の向きを変え 1 ライン上に投影する複数個のミラーを具備することを特徴とする差動式表面プラズモン共鳴現象測定装置。

3. 請求項 2 記載の差動式表面プラズモン共鳴現象測定装置において、前記複数個のミラーは、前記試料溶液固定部からの反射光を第 1 の角度で反射する第 1 のミラーと、前記参照溶液固定部からの反射光を第 2 の角度で反射する第 2 のミラーとを具備することを特徴とする差動式表面プラズモン共鳴現象測定装置。

4. 請求項 1 記載の差動式表面プラズモン共鳴現象測定装置において、前記プリズムの上に該プリズムとその屈折率を整合させた粘着力を持つ光インターフェイス膜を具備することを特徴とする差動式表面プラズモン共鳴現象測定装置。

5. 一定波長を持つ光源からの光をプリズムとガラス基板からなるセンサに線焦点を結ぶように当て、該線焦点上に一定間隔を保って配置された試料セルと参照セルの感応部で生じた表面プラズモン共鳴現象により強度が減少した反射光を、前記試料セルと参照セルの感応部の中心間隔と同じに保持しながら、互いに角度の異なる光分割ミラーを用いて反射させ、試料光と参照光を 2 光路に分割して、一つの C C D ラインセンサの異なる二つの領域で検出する光学系を用いて、前記プリズムの上に該プリズムとその屈折率を整合させた粘着力を持つ光インターフェイス膜に試料部と参照部に対応した感応膜を併せ持った電極式複合型センサセ

ルを押し付けることによって、前記センサ、前記光インターフェイス膜およびプリズム間の光整合性を保ち、前記試料セルと参照セルで生じる表面プラズモン共鳴現象を測定することを特徴とする差動式表面プラズモン共鳴現象測定方法。

6. 請求項 5 記載の差動式表面プラズモン共鳴現象測定方法において、前記光インターフェイス膜が高分子光インターフェイス粘着膜であることを特徴とする差動式表面プラズモン共鳴現象測定方法。

7. 請求項 6 記載の差動式表面プラズモン共鳴現象測定方法において、前記高分子がポリ塩化ビニールであることを特徴とする差動式表面プラズモン共鳴現象測定方法。

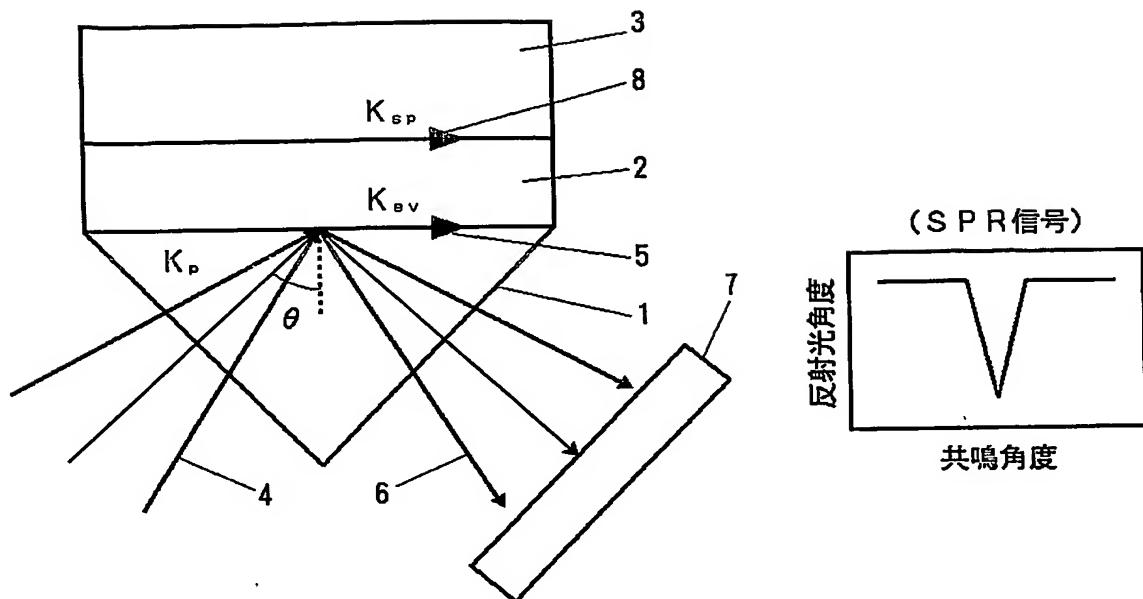
8. 請求項 6 又は 7 記載の差動式表面プラズモン共鳴現象測定方法において、前記光インターフェイス粘着膜上に前記プリズム及びガラス基板と同一の屈折率を持つマッチングオイルなしで前記試料セルを設定することを特徴とする差動式表面プラズモン共鳴現象測定方法。

9. 請求項 8 記載の差動式表面プラズモン共鳴現象測定方法において、機能性物質と相互作用があり、かつその結果屈折率が変化するような物質の化学センサ化を行うことを特徴とする差動式表面プラズモン共鳴現象測定方法。

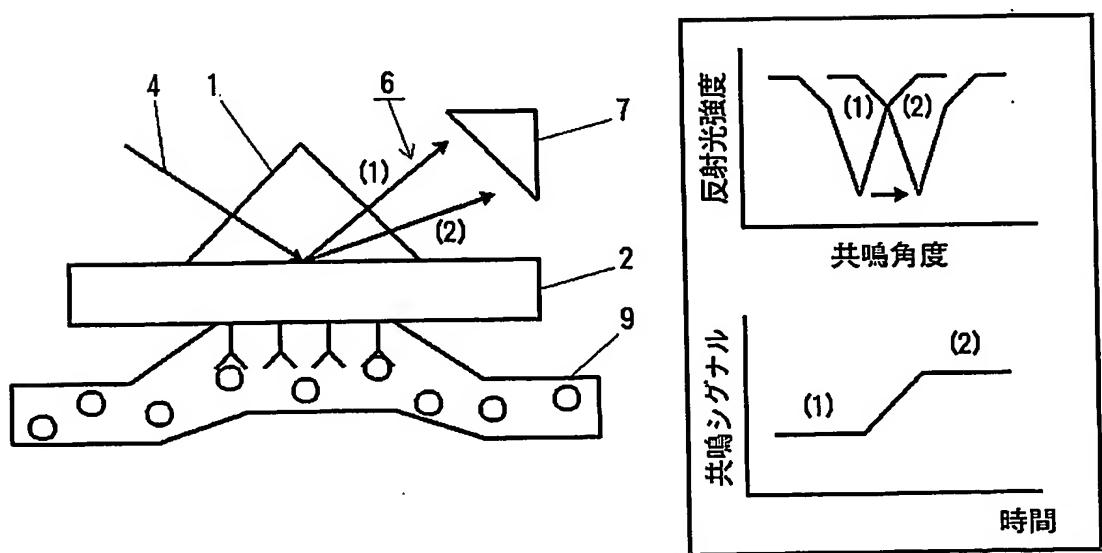
10. 請求項 9 記載の差動式表面プラズモン共鳴現象測定方法において、前記試料セルに抗体を固定することによって抗原－抗体反応を測定する免疫センサ化を行うことを特徴とする差動式表面プラズモン共鳴現象測定方法。

11. 請求項 5 記載の差動式表面プラズモン共鳴現象測定方法において、前記電極式複合型センサセルの押し付けは 20 ニュートン程度の力によることを特徴とする差動式表面プラズモン共鳴現象測定方法。

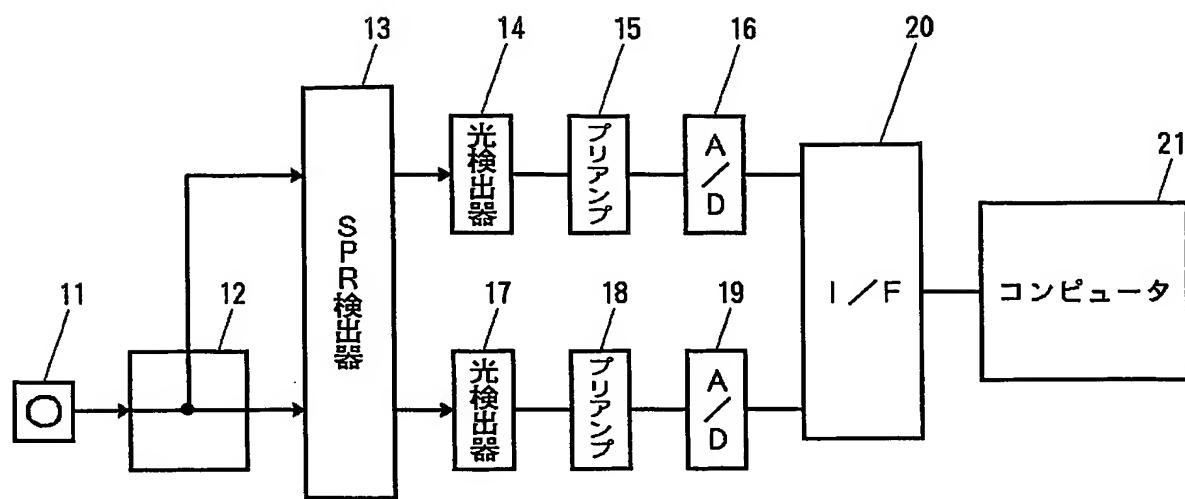
第 1 図



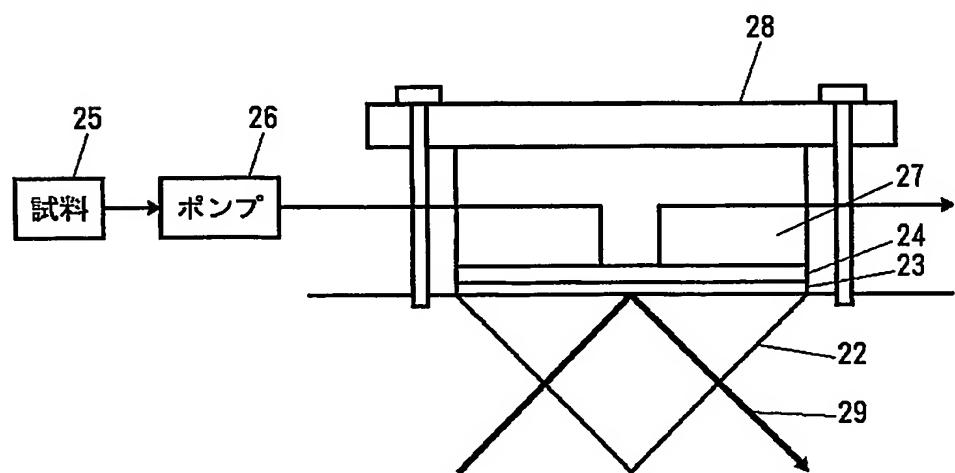
第 2 図



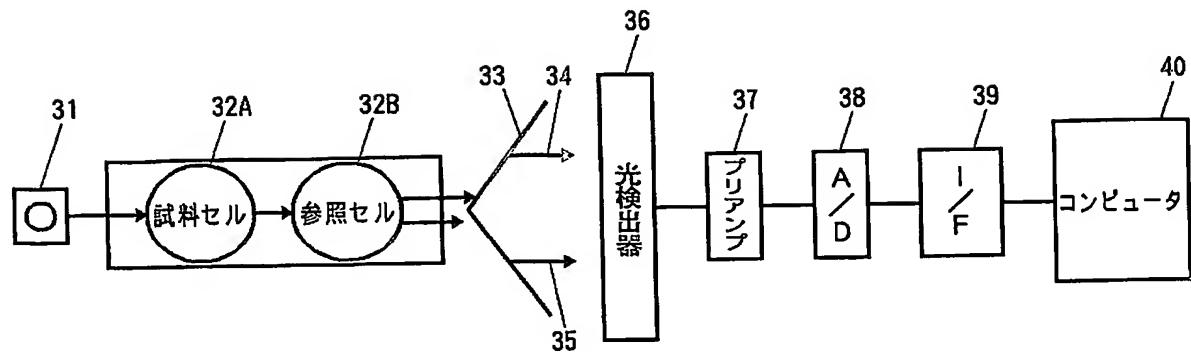
第 3 図



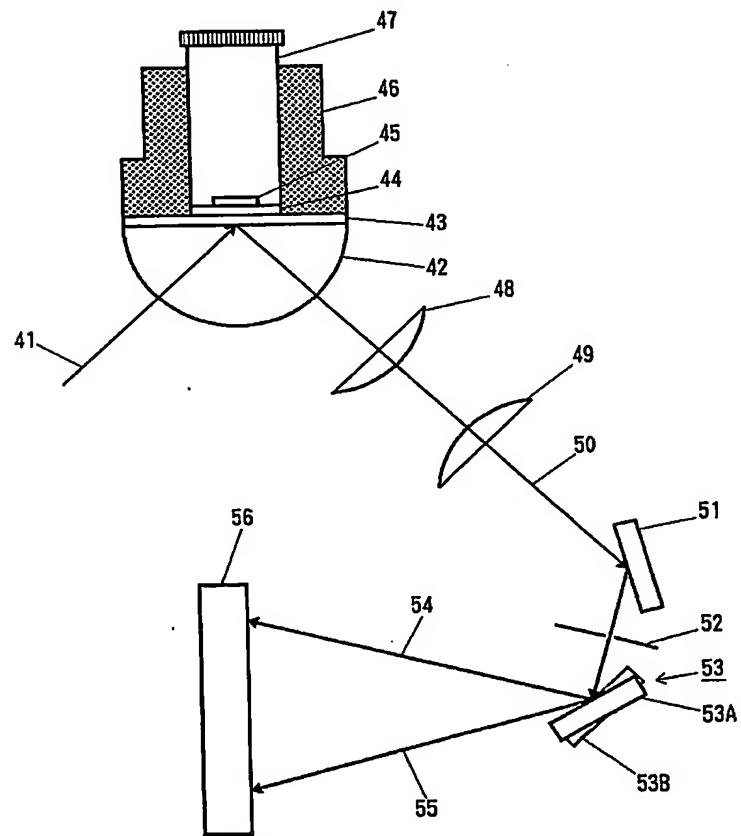
第 4 図



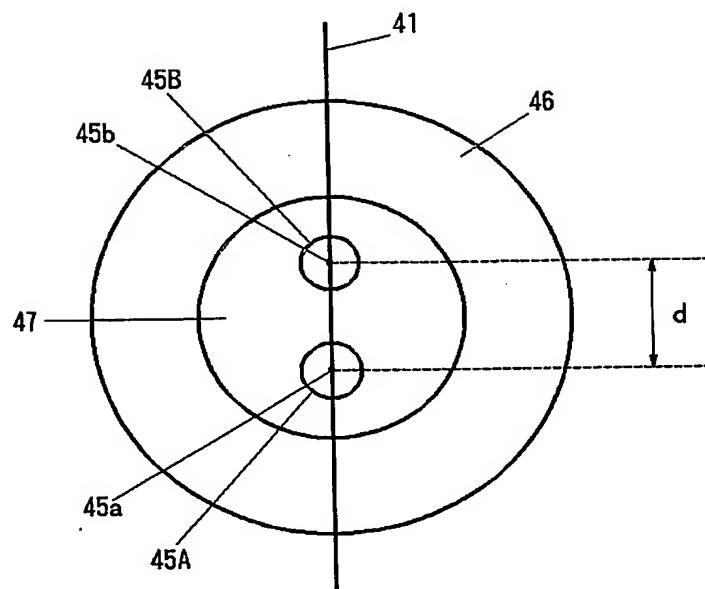
第 5 図



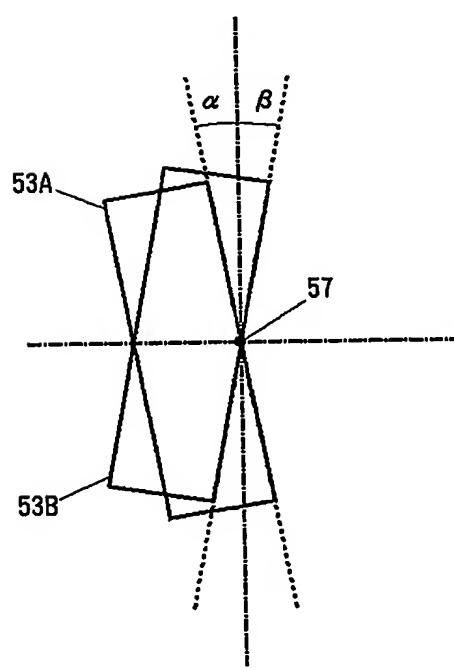
第 6 図



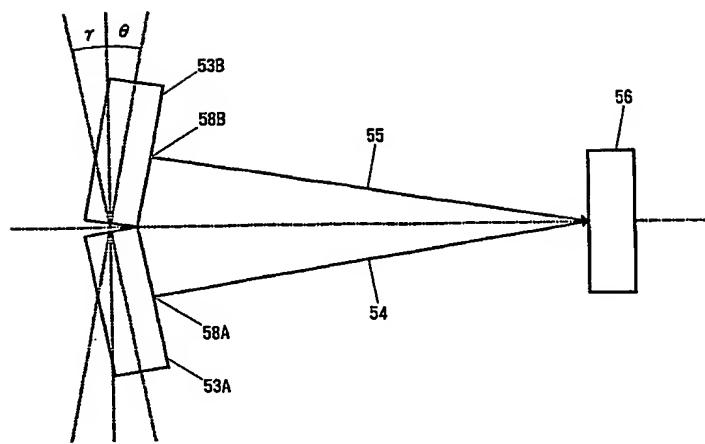
第 7 図



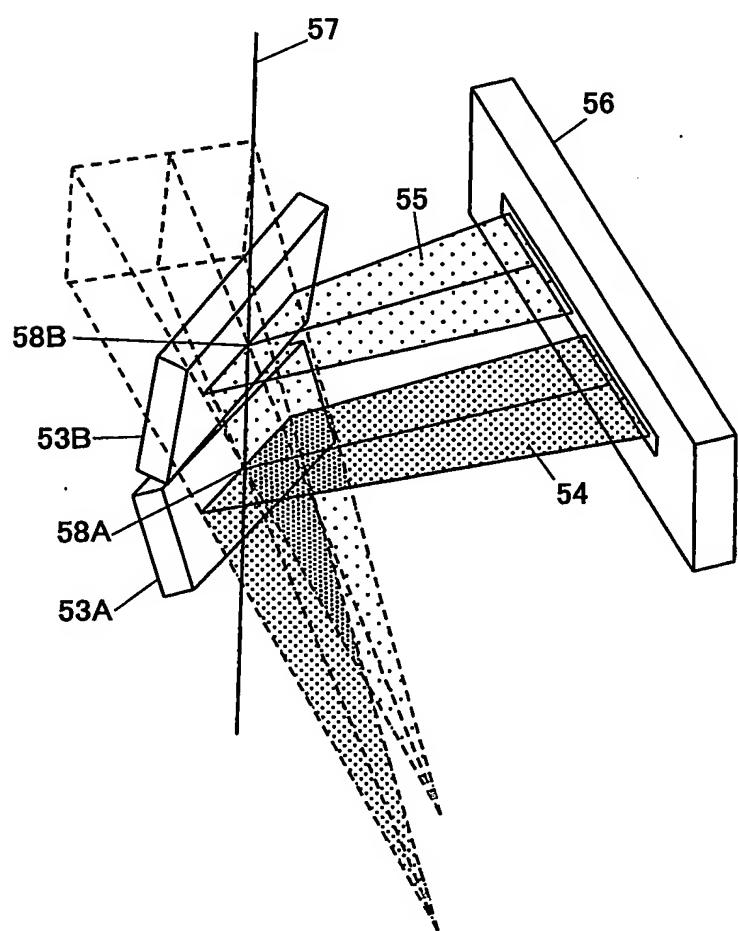
第 8 図



第 9 図

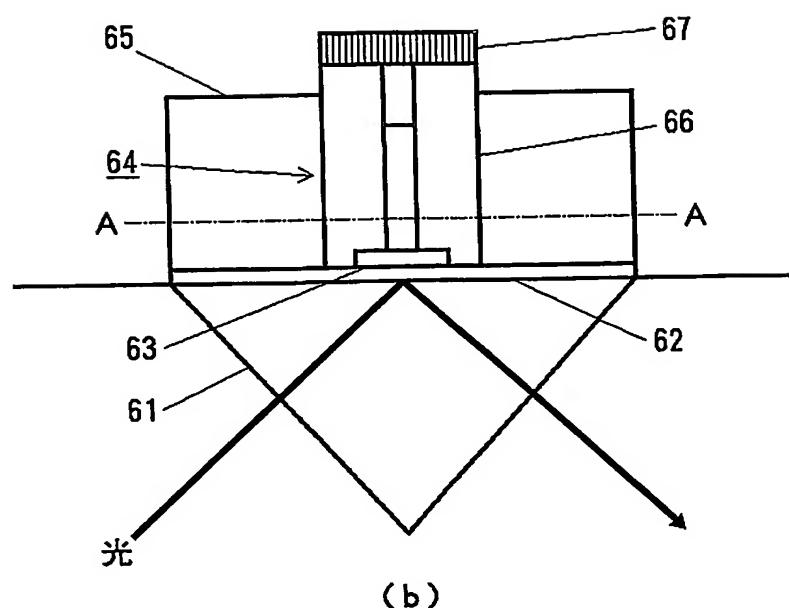


第 10 図

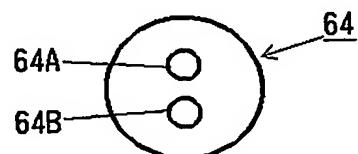


第 11 図

(a)

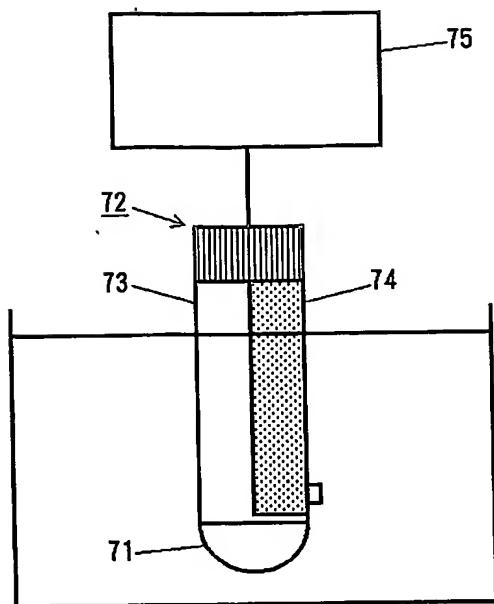


(b)

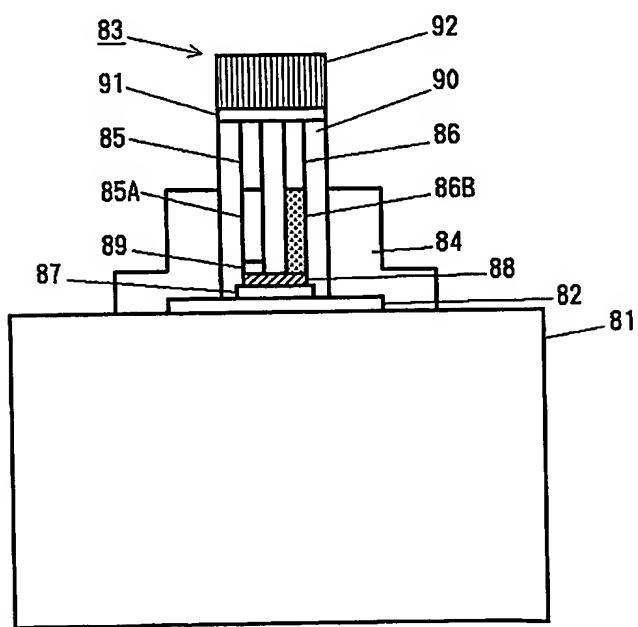


第 12 図

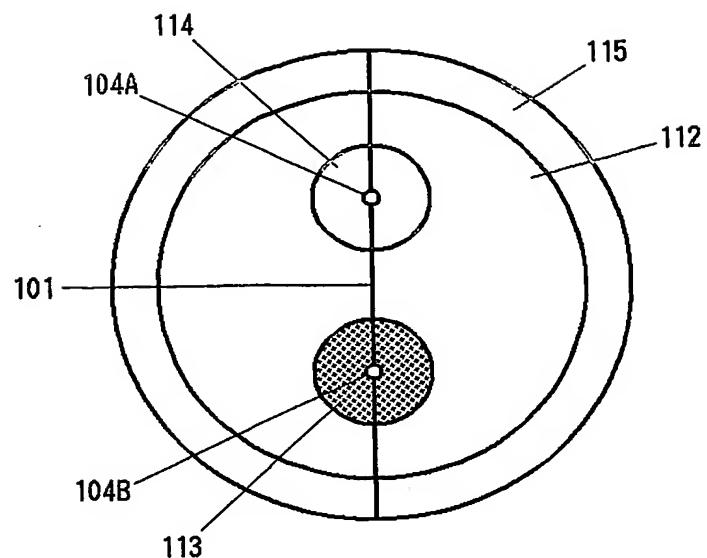
(a)



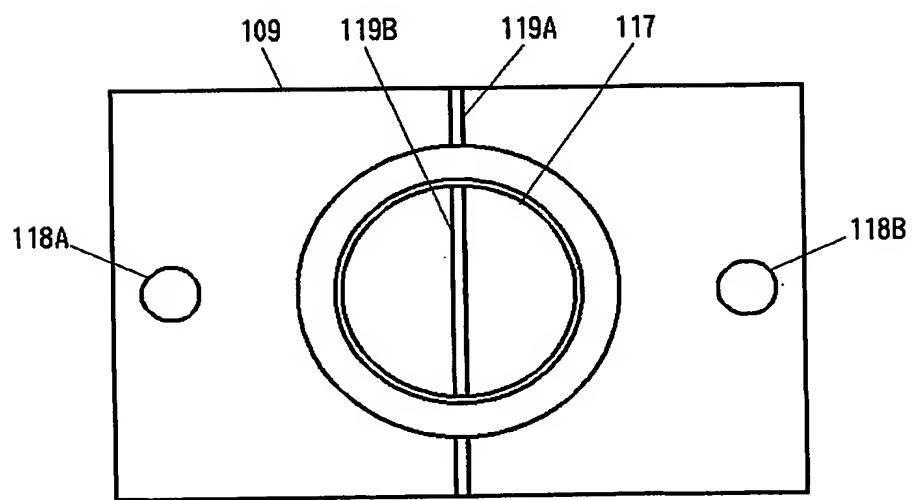
(b)



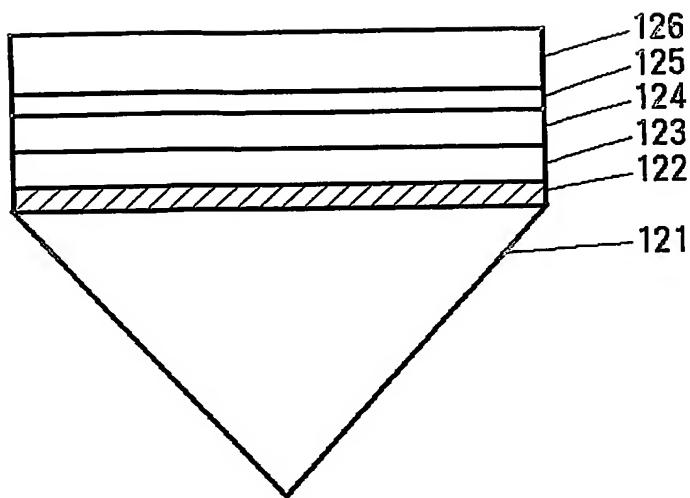
第 13 図



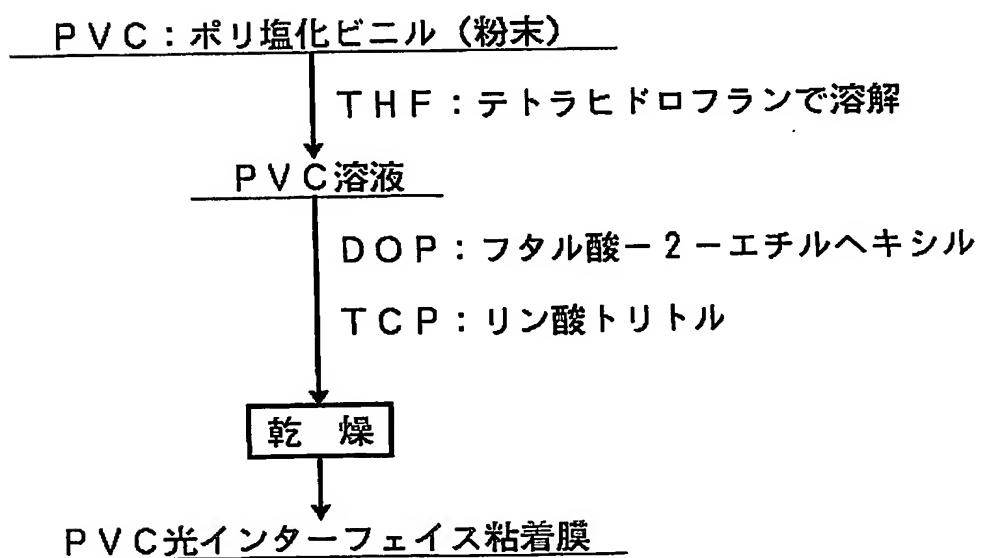
第 14 図



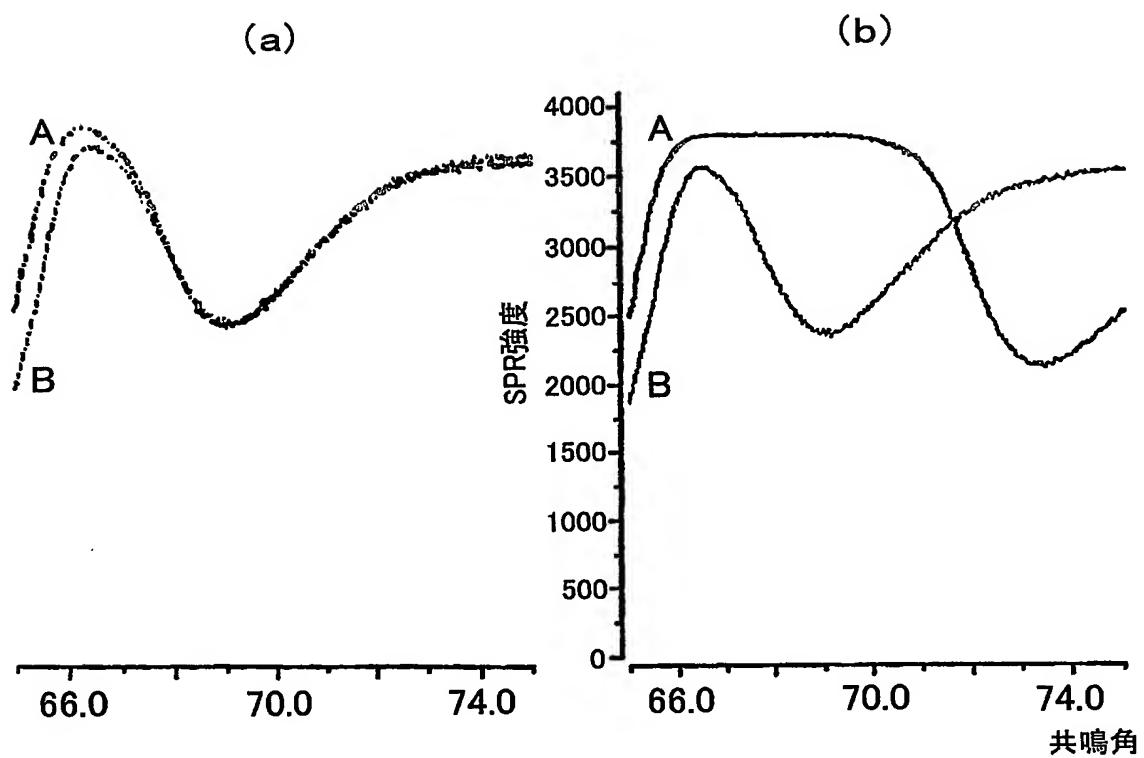
第 15 図



第 16 図

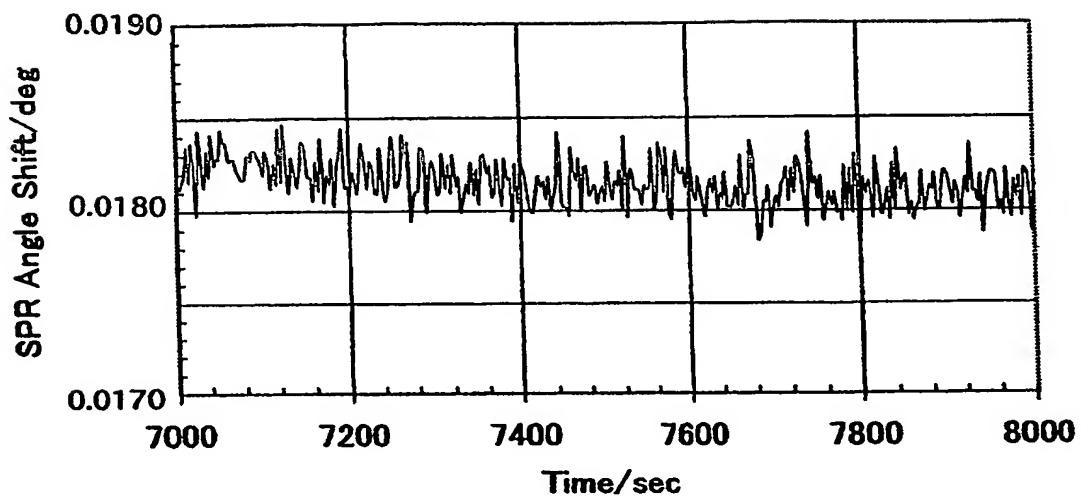


第 17 図

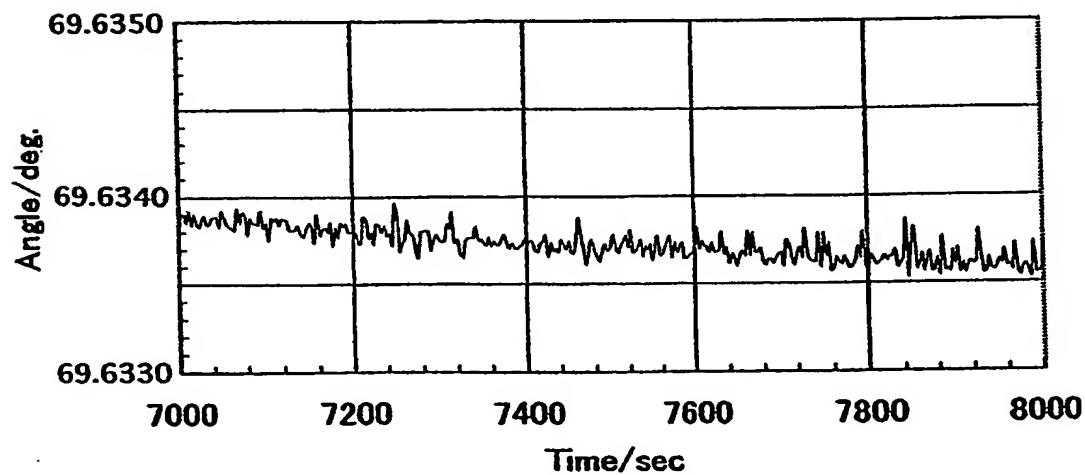


第 18 図

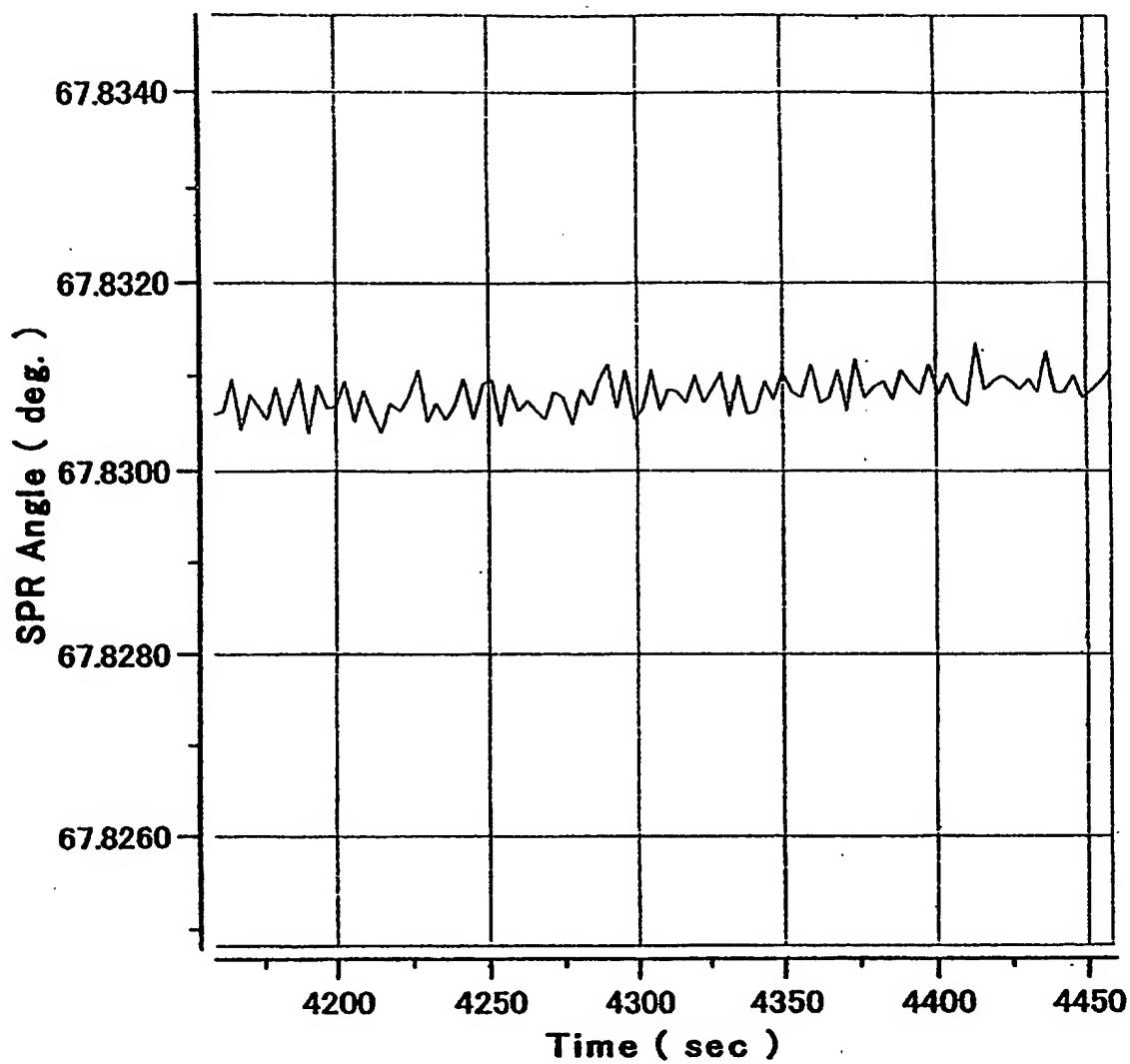
(a)



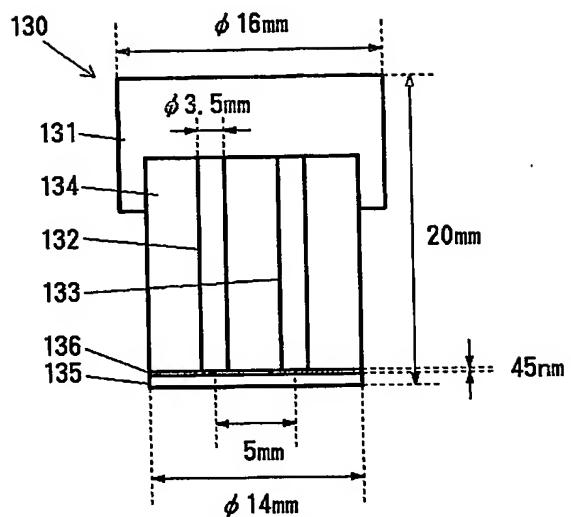
(b)



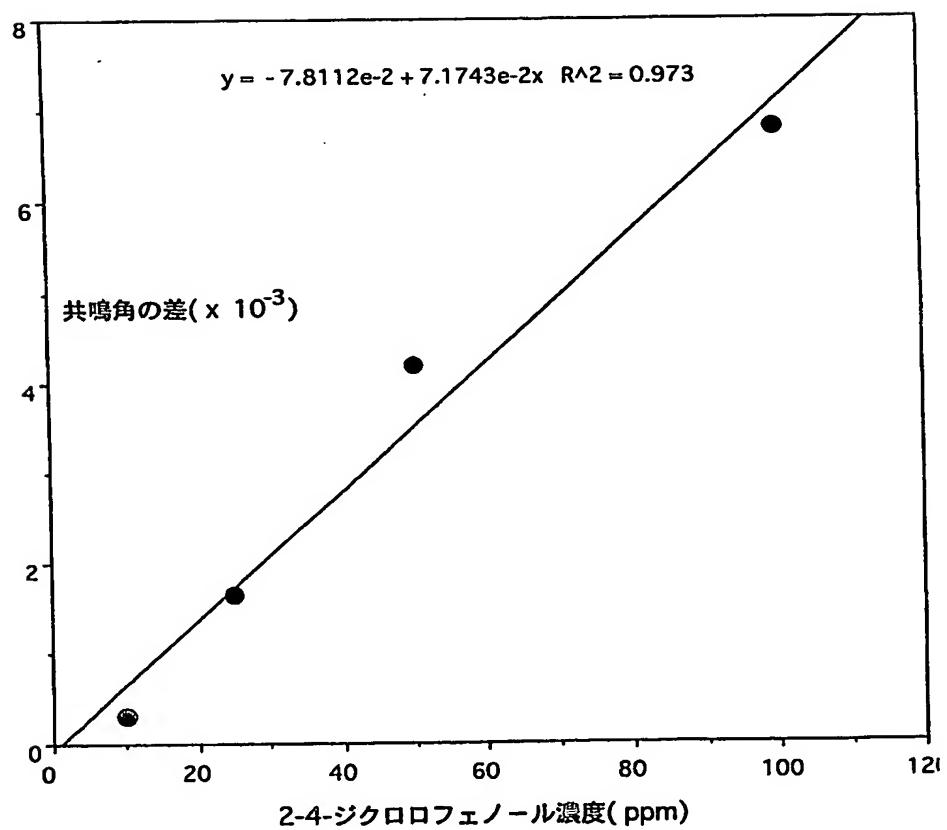
第 19 図



第 20 図



第 21 図



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/JP2004/004428

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
Int.Cl⁷ G01N21/55

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
Int.Cl⁷ G01N21/00-21/61

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched
Jitsuyo Shinan Koho 1922-1996 Toroku Jitsuyo Shinan Koho 1994-2004
Kokai Jitsuyo Shinan Koho 1971-2004 Jitsuyo Shinan Toroku Koho 1996-2004

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)
EPAT, WPI/L, PATOLIS

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	JP 2001-511249 A (Biacore AB.), 07 August, 2001 (07.08.01), Full text & WO 98/34098 A	1, 4
A	JP 9-292333 A (Fuji Photo Film Co., Ltd.), 11 November, 1997 (11.11.97), Full text (Family: none)	1-11
Y	JP 9-257701 A (Toto Ltd.), 03 October, 1997 (03.10.97), Full text (Family: none)	1

Further documents are listed in the continuation of Box C.

See patent family annex.

- * Special categories of cited documents:
- "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date
- "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
- "&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search
22 April, 2004 (22.04.04)

Date of mailing of the international search report
11 May, 2004 (11.05.04)

Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No. PCT/JP2004/004428
--

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
E,A	JP 2003-202289 A (Fuji Photo Film Co., Ltd.), 08 July, 2003 (08.07.03), Full text (Family: none)	1-11
A	JP 9-96605 A (Toto Ltd.), 08 April, 1997 (08.04.97), Figs. 16, 17, 18, 19, 21 (Family: none)	2,3,5
A	JP 2002-214131 A (President of National College of Technology), 31 July, 2002 (31.07.02), Full text (Family: none)	1-11
<u>Y</u> <u>A</u>	JP 2002-214133 A (President of National College of Technology), 31 July, 2002 (31.07.02), Full text (Family: none)	4 <u>6-10</u>
A	JP 7-159319 A (Satoshi KAWADA), 23 June, 1995 (23.06.95), Full text (Family: none)	1-11

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int. C17 G01N21/55

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int. C17 G01N21/00-21/61

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

日本国実用新案公報	1922-1996年
日本国公開実用新案公報	1971-2004年
日本国登録実用新案公報	1994-2004年
日本国実用新案登録公報	1996-2004年

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)
EPAT、WPI/L、PATOLIS

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
Y	JP 2001-511249 A(ハイコアアーベー), 2001. 08. 07, 全文 & WO 98/34098 A	1, 4
A	JP 9-292333 A(富士写真フィルム株式会社), 1997. 11. 11, 全文, (ファミリーなし)	1-11
Y	JP 9-257701 A(東陶機器株式会社), 1997. 10. 03, 全文, (ファミリーなし)	1
E A	JP 2003-202289 A(富士写真フィルム株式会社), 2003. 07. 08, 全文, (ファミリーなし)	1-11
A	JP 9-96605 A(東陶機器株式会社), 1997. 04. 08, Fig. 16, 17, 18, 19, 21, (ファミリーなし)	2, 3, 5
A	JP 2002-214131 A(八戸工業高等専門学校長), 2002. 07. 31, 全文, (ファミリーなし)	1-11
Y A	JP 2002-214133 A(八戸工業高等専門学校長), 2002. 07. 31, 全文, (ファミリーなし)	4 6-10

 C欄の続きにも文献が列挙されている。 パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの
 「E」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの
 「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)
 「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献
 「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの
 「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの
 「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの
 「&」同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

22.04.2004

国際調査報告の発送日

11.5.2004

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/JP)

郵便番号100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

樋口 宗彦

2W 9118

電話番号 03-3581-1101 内線 3290

C (続き) . 関連すると認められる文献		関連する 請求の範囲の番号
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	
A	JP 7-159319 A(河田聰), 1995. 06. 23, 全文, (ファミリーなし)	1-11